

Aus dem Department für Anatomie Tübingen  
Institut für klinische Anatomie

Claudin Expression im Endolymphatischen Dukt und  
Sack – Erste Einblicke in die Regulation der  
parazellulären Barrier

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Runggaldier, Daniel Ulrich  
Geboren in Innsbruck (Austria)

2017

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt
2. Berichterstatter: Professor O. Garaschuk

Tag der Disputation: 20.01.2017

Für meine Frau Yumiko und Tochter Sakura

## Inhaltsverzeichnis

- Abkürzungsverzeichnis (S. 6)
- 1 Einleitung (S. 7)
  - 1.1 Anatomie des Innenohres (S. 8)
  - 1.2 Histologischer Aufbau des ES (S. 9)
  - 1.3 Physiologische und pathophysiologische Aspekte des ES und die Rolle von ADH (S. 10)
  - 1.4 Tight Junctions und Claudine (S. 11)
    - 1.4.1 Struktureller Aufbau der Claudine (S. 13)
    - 1.4.2 Rolle der Claudine bei parazellulären Transportprozessen (S. 14)
    - 1.4.3 Tight Junctions und Claudine im ES (S. 16)
  - 1.5 Fragestellung, Zielsetzung und Durchführung des Projektes (S. 17)
    - 1.5.1 Ultrastrukturelle Unterschiede der TJ im ED und den verschiedenen Abschnitten des ES der postnatalen Tag 4 p04 Ratte (S. 17)
    - 1.5.2 Identifizierung von Claudinen in der Ratte (p04 und p31), die auf mRNA Ebene in endolymphatischen Geweben exprimiert werden (S. 18)
    - 1.5.3 Zelluläre Analyse der Claudin Protein Expression in Häutchenpräparaten des ED und ES der Ratte p04 (S. 18)
    - 1.5.4 Subzelluläre Analyse der Claudin Protein Expression in Kryoschnitten des ED und ES der juvenilen Ratte (P04) im Vergleich zum ES der hörreifen, adulten Ratte p30 (S. 18)
    - 1.5.5 Stimulationen des ED und ES der Ratte (P04) mit dem V2R-spezifischen ADH-Analog 1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin dDAVP (S. 19)
- 2 Material und Methoden (S. 20)
  - 2.1 Tiere und Gewebspräparation (S. 20)
  - 2.2 Transmissionselektronenmikroskopie (S. 20)
  - 2.3 RNA Isolierung aus Gewebeproben und deren Analyse mittels RT-PCR und qPCR - High Performance qPCR Fluidigm System (S. 21)
  - 2.4 Claudin mRNA Expression von stimulierten Einzelpräparaten (S. 22)
  - 2.5 qPCR Daten Auswertung (S. 23)
  - 2.6 Immunfluoreszenz Mikroskopie (S. 23)
- 3 Ergebnisse (S. 24)
  - 3.1 Elektronenmikroskopie von ES und ED Proben der P04 Ratte (S. 24)
  - 3.2 Hochdurchsatz qPCR: Claudin mRNA Expression in p04 und p30 ES bzw. ED Proben (S. 24)

- 3.3 Immunfluoreszenz Mikroskopie von Kompletpräparaten und Schnitten des ED und ES (S. 29)
- 3.4 Subzelluläre Lokalisation von Claudinen in Kryoschnitten des p04 ED und ES (S. 31)
- 3.5 Regulierbarkeit der mRNA Expression und subzellulären Lokalisation von Claudinen im ES Epithel der p04 Ratte (S. 34)
- 4 Diskussion (S. 38)
  - 4.1 Identifizierung von Claudin Molekülen im ED und ES (S. 38)
  - 4.2 Stimulierbarkeit von Claudinen in endolymphatischen Epithelien (S. 41)
  - 4.3 Vergleich der gewonnen Expressionsdaten mit denen aus adulten Geweben (S. 43)
- 5 Zusammenfassung (S. 44)
- 6 Hinweise zur Veröffentlichung (S. 46)
- 7 Literatur und Quellen (S. 47)
- 8 Erklärung zum Eigenanteil (S. 54)
- 9 Tabellarischer Lebenslauf (S. 55)

## **Abkürzungsverzeichnis**

Antidiuretisches Hormon (ADH)

Aquaporine (AQP)

Basal Invagination (BI)

cyclic Adenosin Monophosphat (cAMP)

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)

dDAVP: 1-Desamino-8-D-Arginin-**Vasopressin**

Distal Sac Portion (DSP)

Endolymphatischer Dukt (ED)

Endolymphatischer Hydrops (EH)

Endolymphatischer Sack (ES)

Epithelial Sodium Channel (ENaC)

Intermediate Sac Portion (ISP)

Mitochondria Rich Cell (MRC)

Morbus Meniere (MM)

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup>-Kotransporters (NKCC)

Normalized Relative Quantity (NRQ)

Protein Kinase A (PKA)

Protein Kinase C (PKC)

Proximal Sac Portion (PSP)

Reverse Transkription – PCR (RT-PCR)

Ribosome Rich Cells (RRCs)

STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase (SPAK)

Surrounding Tissue, perisakkulär gelegen (ST)

Tight Junction (TJ)

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Vasopression 2 Receptor (V2R)

With No Lysine Kinase (WNK)

Zonula occludens - Protein 1 (ZO-1)

## 1 Einleitung

Der Saccus endolymphaticus (endolymphatischer Sack, ES) als Teil des Innenohres liegt als Ausstülpung des membranösen Labyrinths mit seinem proximalen und intermediären Teil im Felsenbein bzw. mit seinem distalen Ende in einer Duraduplikatur in der Nähe des *Sinus sigmoideus*. Der ES steht dabei über den Ductus endolymphaticus (endolymphatischer Dukt, ED) in direkter Verbindung mit dem endolymphatischen Raum der *Cochlea* und des Vestibularorgans (1, 2). Man nimmt an, dass sowohl der ES als auch der ED in der Regulation der endolymphatischen Flüssigkeits- und Ionenhomeostase involviert sind (3-6), allerdings sind die exakte Rolle der unterschiedlichen Abschnitte des ED und ES und deren zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht hinreichend geklärt. Gegenwärtig wird angenommen, dass die transepitheliale Flüssigkeits- und Ionenhomeostase sowohl über trans- als auch über parazelluläre Mechanismen erfolgen kann (7, 8). Bisher wurden vor allem Untersuchungen zu transzellulären Transportprozessen im ES durchgeführt und dabei die Expression einer Reihe von Kanälen und Wassertransportern identifiziert wie zum Beispiel Aquaporine (AQP), der *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) (9), epitheliale Natriumkanal (ENaC) (10), Pendrin (5),  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$  Kotransporters (NKCC)(11-13). Im Gegensatz dazu ist nur sehr wenig über parazellulären Mechanismen bekannt, die Einfluß auf die endolymphatische Ionen- und Flüssigkeitshomöostase haben können. Diese parazellulären Transportvorgänge werden durch Zell-Zell Verbindungen reguliert, die auch als Tight Junctions (TJ) bekannt sind. Dabei sind die apikalen Pole der lateralen Membranen zweier Zellen durch versiegelnde Stränge miteinander verbunden, die aus Mitgliedern der Claudin Familie und assoziierten Proteinen wie dem *Zonula occludens* - Protein 1 (ZO-1), *Zonula occludens* - Protein 2 (ZO-2) sowie Occludin oder den Marvelproteinen aufgebaut sind (14-16). Die Claudine werden allerdings nicht mehr nur als Epithelien versiegelnde Moleküle betrachtet, die die Zell-Zell Verbindungen dicht machen und somit einen parazellulären Wasser und Ionenfluß unterbinden. Vielmehr können die Claudin Familienmitglieder in barriere- und porenbildende Moleküle untergliedert werden, je nachdem, ob Sie die parazelluläre Dichtigkeit einer Zellschicht erhöhen (17) oder reduzieren (18-20). Daher ist es nicht erstaunlich, dass die Kombination der Expression der Claudine und deren quantitatives Verhältnis die parazelluläre Permeabilität für Ionen und Flüssigkeit letztendlich regulieren können (21). Bereits in den 1980er Jahren wurden in verschiedenen Studien TJ auch in Epithelien des ES identifiziert. Vor allem elektronenmikroskopische Analysen von Gefrierbruch-Replikas und

Lanthanum Injektionsexperimente konnten dabei zeigen, dass sich der ED und die verschiedenen Teile des ES im ultrastrukturellen Erscheinungsbild der TJ und der parazellulären Permeabilität für Schwermetallionen unterscheiden können (22, 23). Kürzlich wurde auch die mRNA Expression von einigen Claudin Familienmitglieder im ES charakterisiert (24, 25). Allerdings sind bisher kaum weitere Daten bezüglich der Rolle der verschiedenen Teile der endolymphatischen Epithelien bei parazellulären Flüssigkeits- und Ionentransporten und deren zugrundeliegenden Mechanismen bekannt. Ziel dieser Studie war es somit jene Claudine zu identifizieren, die die TJs in ED und ES Epithelien formen und somit deren Barriereigenschaften maßgeblich beeinflussen. Kommt es zu einer Fehlregulation der Ionen und Flüssigkeitshomöostase der Endolymphe, so kann es histopathologisch zur Ausbildung des endolymphatischen Hydrops (EH) und der damit assoziierten Erkrankung des Morbus Menière (MM) kommen (2, 4). Diese ist charakterisiert durch eine klassische Trias mit Schwindel, Tieftonhörverlust und Tinnitus (2). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass erhöhte Spiegel des anti-diuretischen-Hormons (ADH) nicht nur häufig mit dem Auftreten des MM korreliert sind (26, 27) sondern auch, dass die chronische Verabreichung von ADH im Tiermodell einen EH mit entsprechender klinischer Symptomatik induzieren kann (28-30). Somit wurden in einem weiteren Schwerpunkt unserer Studie die Auswirkungen von ADH auf die Expression sowie subzelluläre Lokalisation der identifizierten Claudine untersucht, um Hinweise auf mögliche ADH regulierte parazelluläre Transportvorgänge zu gewinnen

### 1.1 Anatomie des Innenohres

Das Innenohr ist ein im Felsenbein lokalisiertes neurosensorisches Organ, das aus der *Cochlea*, dem Vestibularorgan und dem endolymphatischen Sack (ES) besteht. Der dabei im Felsenbein gebildete knöcherne Kanal, der mit Perilymphe gefüllt ist und das eigentliche Sinnesorgan beinhaltet, wird als *Labyrinthus osseus* bezeichnet. In diesem aufgehängt und gleichsam von Perilymphe umgeben findet sich der *Labyrinthus membranaceus*, welcher einen abgeschlossenen Raum für die Endolymphe formt und gleichzeitig die Sinneszellen von *Cochlea* und Vestibularorgan beherbergt (1, 2). Der Aufbau der *Cochlea* ist durch einen schneckenförmig gewundenen Gang charakterisiert, der sich somit in insgesamt 3 Etagen untergliedern lässt. Kranial befindet sich die *Scala vestibuli*, die mit Perilymphe gefüllt ist und nur durch eine dünne Reissner'sche Membran von der darunter befindlichen *Scala media* abgetrennt



ist. Diese auch als *Ductus cochlearis* bezeichnete Etage ist mit Endolymphe gefüllt und beinhaltet unter anderem die auf der Basilarmembran aufsitzenden Haarsinneszellen. Unter der Basilarmembran befindet sich als unterste Etage die *Scala tympani*, die wiederum mit Perilymphe gefüllt ist (2). Entscheidend ist daher die Differenzierung von zwei topographisch unterschiedlichen und voneinander abgetrennten Räumen: Der perilymphatische Raum der *Scala vestibuli* und *Scala tympani* formt über den *Aqueductus vestibuli* und den *Aqueductus cochleae* eine direkte Verbindung mit dem Subarachnoidalraum. Im Gegensatz dazu bildet der endolymphatische Raum des *Ductus cochlearis* nicht nur mit dem Vestibularorgan ein Kontinuum sondern steht auch über den endolymphatischen Dukt (ED) in direkter Verbindung mit dem ES (1).

## 1.2 Histologischer Aufbau des ES

Anatomisch wurde der ES bereits 1927 in insgesamt 3 Abschnitte unterteilt (31): Der proximale Abschnitt (proximal sac portion: PSP) mit Übergang zum ED und der intermediäre Anteil (intermedial sac portion: ISP) befinden sich intraossär im Felsenbein während der distale Teil (distal sac portion: DSP) des ES bereits extraossär zu liegen kommt und in unmittelbarer Nähe des *Sinus sigmoideus* von einer Duraduplikatur umfasst wird (1, 2). Auch wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass der ES speziell beim Menschen keine einfache sackförmige Struktur besitzt sondern vielmehr durch einen tubulären, zum Teil stark verzweigten Aufbau charakterisiert ist (32). Bei der Ratte hingegen nimmt der ES nur eine eher einlumige (kugelige, oder ballonartige) Struktur ein (33). Vor allem in den 1980er Jahre wurde mittels elektronenmikroskopischen Techniken viel von unserem heutigen Wissen über den ultrastrukturellen Aufbaus des ES gewonnen (34, 35), das bis heute durch einige neuere Studien verfeinert wurde (36): Das endolymphatische Epithel weist dabei einen einschichtigen Aufbau auf und beinhaltet je nach Lokalisation unterschiedliche Zelltypen: Der ED zeigt bei verschiedenen Spezies ein meist kuboidales Epithel mit Zellen reich an Ribosomen (Ribosoma rich like cells: RRLCs), die in ihrer Form bestimmte Ähnlichkeiten mit den ribosomenreichen Zellen (RRCs) des ES zeigen (35, 37). Im ES hingegen wurden mitochondrienreiche Zellen (MRCs) und RRCs als die beiden vorherrschenden Zelltypen beschrieben. Bei der Ratte variiert dabei deren Anteil und morphologisches Erscheinungsbild je nach Region des Sacks. So wurde beispielsweise in der PSP von Ratten der Anteil von MRCs mit 10 – 15%, in der ISP hingegen mit 20 – 25% beziffert. Demgegenüber entspricht der

Großteil der Zellen in diesen Bereichen des ES dem RRC-Typ. Auch in der DSP wurde der RRC-Typ als dominierend beschrieben, wobei gleichzeitig eine leicht abweichende Morphologie der beiden Zelltypen im Gegensatz zur PSP und ISP auffällig war (33). Bei humanen ES Proben wurden in einer neuen Studie mit optimierten Fixationstechniken in der PSP und ISP insgesamt 3 Zelltypen unterschieden (36). Die Mehrzahl der Zellen entsprach dabei einem Mischtyp (nicht genau klassifizierbarer Zelltyp), da diese morphologisch sowohl Aspekte von MRCs als auch RRCs aufwies. Nur ca. 20% der gesamten Zellen in der humanen ISP konnten hingegen exakt den MRCs bzw. RRCs zugeordnet werden. Im Gegensatz zur PSP und ISP konnte in der gleichen Studie in der DSP ein eher flaches Epithel mit einem weiteren Zelltyp beschrieben werden, der durch eine geringe Menge an intrazellulären Vesikeln und Mikrovilli charakterisiert war (36). Zusammenfassend kann hier also festgestellt werden, dass der ES mit seinen Anteilen bei vielen Spezies histologisch vor allem MRCs und RRCs aufweist, wobei auch Mischformen und morphologische Abweichungen dieser Zellen in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies in der Literatur beschrieben sind. Die exakte Funktion dieser Zellen und deren Rolle bei den physiologischen Prozessen des ES sind bislang allerdings nur sehr unzureichend verstanden.

### 1.3 Physiologische und pathophysiologische Aspekte des ES und die Rolle von ADH

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass der ES verschiedene Funktionen einnimmt: Neben einer endokrinen (38) und immunologischen Rolle (39) wird auch eine Funktion des ES in der Regulation der endolymphatischen Ionen- und Flüssigkeitshomöostase diskutiert. Daten haben hierbei gezeigt, dass eine chirurgische Obstruktion des ES tatsächlich einen sogenannten EH auslösen kann – ein Zustand, bei dem sich die Reissner Membran durch erhöhten Druck im *Ductus cochlearis* in den perilymphatischen Raum der *Scala vestibuli* vorwölbt (40). Dieser EH wird auch als histopathologisches Korrelat des MM verstanden – einer Innenohrerkrankung, die mit einer Dysregulation der endolymphatischen Flüssigkeits- und Ionenhomeostase in Verbindung gebracht wird und durch Tieftonhörverlust, Vertigo und Tinnitus charakterisiert ist (2, 41). Studien haben zudem gezeigt, dass der attackenweise auftretende MM häufig mit erhöhten ADH Spiegeln korreliert (26, 42, 43). ADH, auch als Vasopressin bekannt, ist ein Hormon, welches ursprünglich als essentieller Regulator der renalen Wasserresorption identifiziert wurde. Dabei induziert ADH nach Bindung an den

Vasopressin 2-Rezeptor (V2R) in Nierentubuluszellen über den cyclischen Adenosinmonophosphat- (cAMP-) und Proteinkinase A- (PKA-) Signalweg die Translokation von Aquaporin-2 (AQP2) von intrazellulären Vesikeln in die luminalen Membranen, sodass – auch in Zusammenspiel mit dem basolateral lokalisierten AQP4 – Wasser entlang seines osmotischen Gradienten aus den Nierentubuli herausgezogen und damit resorbiert werden kann (44). Seit dem Nachweis der AQP2 und V2R Expression in Epithelien des ES wird auch ein der Niere ähnlicher Mechanismus bei der Pathogenese des MM vermutet (11, 45). Tatsächlich haben verschiedene Tierstudien gezeigt, dass die Verabreichung größerer Dosen ADH oder V2R Analoga auch einen EH (28, 29, 46) und damit assoziierte Menière'sche Symptomatik (30) zur Folge haben kann. Neuere Veröffentlichungen haben aber auch gezeigt, dass die Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs nicht nur transzelluläre sondern auch parazelluläre Transportprozesse beeinflussen kann (47, 48). Zusammenfassend ist aber festzustellen, dass die Physiologie der endolymphatischen Ionen- und Flüssigkeitshomöostase und die transzellulären bzw. parazellulären Komponenten sowie die Rolle von ADH an diesen Prozessen nicht hinreichend aufgeklärt sind.

#### 1.4 Tight Junctions und Claudine

Alle inneren und äußeren Körperoberflächen werden durch epitheliale Zellverbände ausgekleidet. Damit entsprechende Kompartimente abgrenzt und deren spezifische Funktionen erfüllt werden können, ist es von essentieller Bedeutung, dass der transepitheliale Ionen- und Wasserfluß strikt reguliert wird (49). Es ist hinreichend bekannt, dass sich die transepithelialen Transportprozesse dabei in eine transzelluläre sowie parazelluläre Komponente untergliedern lassen (7, 8): transmembranäre Transportvorgänge, die beispielsweise durch Moleküle wie den Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup>-Kotransporter (NKCC), den epithelialen Natriumkanal (ENaC) oder Wasserkanäle, die Aquaporine (AQP) vermittelt werden, sind intensiv beforscht und werden heute als entscheidende Komponenten der transzellulären Flüsse durch das Epithel angesehen (50-52). Parazelluläre Transportvorgänge hingegen werden durch Zell-Zell Verbindungen an den apikalen Polen der lateralen Membranen zweier benachbarter Zellen reguliert (53). Diese auch als TJ bekannten Strukturen besitzen in ihren extrazellulären Bereichen Stränge, die wiederum mit extrazellulären TJ-Strängen der Nachbarzellen interagieren. Dabei können komplexe interzelluläre

Versiegelungen der Epithelschicht ausgebildet und parazellulären Transportvorgänge effizient reguliert werden. Die intrazellulären Anteile der TJ stehen hingegen über sogenannte *Scaffolding*-Proteine mit verschiedenen anderen Molekülen wie beispielsweise Signalmolekülen oder dem Zytoskelett in Verbindung (16, 54). Neuere Daten liefern mehr und mehr Hinweise darauf, dass diese großen TJ Komplexe neben der Regulation von parazellulären Transportprozessen auch an einer Vielzahl von anderen Prozessen beteiligt sind wie etwa an der Steuerung des Zytoskeletts, der Regulation von Signaltransduktionswegen oder dem Zellzyklus (55-57). Erst Mitte der 1980er Jahre, viele Jahre nach der ultrastrukturellen Erstbeschreibung der TJ, begann die Aufklärung der molekularen Komponenten von TJ, die sich grob in die 2 Gruppen der *Scaffolding*- und der Transmembranproteine untergliedern lassen. Das erste identifizierte TJ Molekül war das *Scaffolding* Protein Zonula occludens -1 (ZO-1), das bereits 1986 mit der Isolierung einer TJ Proteinfraction aus Lebergewebe gewonnen wurde und sich danach zu einem der am besten charakterisierten TJ Moleküle entwickelte (58). ZO-1 und dessen Verwandte ZO-2 bzw. ZO-3 sind zytoplasmatisch lokalisiert und können über zahlreichen Domänen eine Vielzahl von transmembranären TJ Molekülen wie Claudine oder Occludin binden oder mit zytoskeletalen Komponenten wie Aktin oder Aktin-bindenden Molekülen interagieren (59-61). Obwohl eine große Menge an Daten zeigt, dass diese ZO-Moleküle als zentrale *Scaffolding*-Einheiten eine entscheidende Rolle bei der Zusammensetzung, und Regulation von TJ spielen (62, 63), so sind dennoch die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen vielfach nicht oder nur lückenhaft verstanden. Die zweite Gruppe von TJ Molekülen umfasst hingegen transmembranäre Proteine, die wiederum zahlreiche Vertreter wie die Familie der Claudine, der *Tight Junctions Associated Marvel domain containing proteins* (TAMPs) mit Occludin, Tricellulin oder Marvel D3 und der *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs) beinhalten (54). Erst in den späten 1990er Jahren konnte durch richtungsweisende Experimente gezeigt werden, dass Mitglieder der Claudin Familie die grundlegenden Komponenten für den molekularen Aufbau der TJ Strängen darstellen und deren physiologische Barrierefunktion entscheidend mitbestimmen (14, 64). Mit diesen Daten wurde Ende der 1990er Jahre schließlich die Entwicklung der Barriereforschung mit der intensiven Charakterisierung von Claudinen eingeleitet.

#### 1.4.1 Struktureller Aufbau der Claudine

Claudine gehören zu einer Familie mit derzeit 27 Vertretern, wobei die Familienzugehörigkeit von einigen dieser Vertreter kontrovers diskutiert wird (65, 66). Um nun die Mechanismen der Claudine bei der Ausbildung von parazellulären Barrieren oder Poren mit ihrer spezifischen Ionen- bzw. Größenselektivität in den TJ wirklich verstehen zu können ist ein detailliertes Wissen über die Struktur sowie das Interaktionsverhalten der verschiedenen Claudine essentiell. Trotz dieser Wichtigkeit sind auch heute noch die strukturellen Aspekte, Claudin-Protein-Interaktionen und vor allem die sich daraus ableitenden Barriereigenschaften nur unzureichend verstanden. Über viele Jahre trugen speziell bioinformatische Methoden bzw. computergestützte Modellerstellung (67-69) sowie Mutationsexperimente mit dem Austausch von bestimmten Aminosäuren zum strukturellen Verständnis und der Erforschung des Interaktionsverhaltens bei (70). Große Meilensteine wurden allerdings erst kürzlich im Jahr 2014 bzw. 2015 mit der Gewinnung der ersten Kristallstrukturen von Claudin 15 und 19 erreicht, die nun auch exaktere Vorhersagen zur Struktur von anderen Claudin Familienmitgliedern und deren Barriere- bzw. Poreneigenschaften ermöglichen (71, 72). Grundsätzlich sind Claudine transmembranäre Proteine mit einem relativ kurzen, zytoplasmatischen N-Terminus. Auf diesen folgen die erste transmembranäre Region sowie der erste extrazelluläre Loop (ECL1). Nach 2 weiteren transmembranären Abschnitten ist der deutlich kleinere zweite extrazelluläre Loop (ECL2) zu finden. Das Polypeptid endet schließlich mit einer vierten transmembranären Region und einem zytoplasmatisch gelegenen relativ langen und variablen C-Terminus (73). Das Interaktionsverhalten der Claudine wird dabei im Allgemeinen durch eine hoch konservierte Region in der ECL2 bestimmt. Im Vergleich zu den beiden extrazellulären Domänen wird dem zytoplasmatischen, C-terminale Abschnitt hingegen eine regulatorische Funktion zugeschrieben. Die meisten Claudine verfügen in dieser Region über eine sogenannte PDZ-Bindungsdomäne, die mit zahlreichen *Scaffolding*-Proteinen wie beispielsweise dem ZO-1 interagiert (74). Zudem konnten Studien zeigen, dass die C-terminale Region intensiver posttranslationaler Modifizierung unterliegt und dass dadurch die Funktion und subzelluläre Lokalisationen der Claudine maßgeblich reguliert werden können. In diesem Zusammenhang beschreiben beispielsweise einige Veröffentlichungen, dass die korrekte Lokalisation von einigen Claudinen in

TJ die Palmitoylierung der C-terminale Cysteinreste voraussetzt. Desweiteren wurden einige Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Region identifiziert, die schlecht konserviert und für jedes Claudin spezifisch zu sein scheinen. So induziert die Phosphorylierung von Cldn1 durch die beiden Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) den Einbau des Claudins in die TJ. Anders verhält es sich hingegen mit Cldn3 und Cldn4, die durch PKA abhängige Phosphorylierung aus den TJ heraus in das zytoplasmatische Kompartiment translozieren können (48). Zusammenfassend sprechen diese Daten somit dafür, dass die ECL1 und ECL2 primär für die Poreneigenschaften bzw. Claudin-Interaktionen essentiell sind, während die C-terminale Region über posttranslationale Modifikationen und Interaktionen mit Scaffolding Molekülen an regulatorischen Prozessen der TJ beteiligt ist.

#### 1.4.2 Rolle der Claudine bei parazellulären Transportprozessen

Elektrophysiologische Untersuchungen, Überexpressionsstudien und auch die Generierung von Knock-Out Mäusen haben einen essentiellen Beitrag zur Charakterisierung der Funktion und Rolle von Claudinen bei parazellulären Transportprozessen geleistet. Ende der 1970er Jahre, fast 2 Dekaden vor der Identifizierung der Claudine, deuteten anfängliche elektrophysiologische Studien daraufhin, dass der transepitheliale Widerstand in logarithmischem Ausmaß mit der Anzahl der parallel verlaufenden TJ Stänge zunimmt (75). Einige Jahre später wurde dies aber widerlegt. Damalige Daten zeigten nämlich, dass Epithelien mit einem ähnlichen ultrastrukturellen Aufbau der TJ unterschiedliche transepitheliale Permeabilitätseigenschaften aufweisen können, die zum Teil von der Ladung und der Größe der penetrierenden Moleküle abhängig sind (76, 77). Somit wurden in den 1980er Jahren bereits die ersten Indizien dafür geliefert, dass TJ möglicherweise nicht nur als Barrieren fungieren sondern auch eine spezifische Porenfunktion einnehmen können. Ende der 1990er Jahre wurde schließlich aufgrund von wegweisenden Studien die Familie der Claudine als essentielle und permeabilitätsbestimmende Komponente der TJ identifiziert. Durch Überexpression von Claudin 1 und 2 in Fibroblasten – Zellen, die in der Regel über keine TJ verfügen – konnte beispielsweise die Bildung von charakteristischen TJ Strängen und eine Zunahme des transepithelialen Widerstandes in Zellkultur induziert werden. Im weiteren Verlauf konnte auch mittels elektronenmikroskopischer Analysen von Immunogold-Färbungen an

Gefrierbrüchen nachgewiesen werden, dass die TJ Stränge tatsächlich aus polymerisierten Claudineinheiten aufgebaut sind (14, 78). Bereits kurze Zeit nach der Erstbeschreibung der Claudine als TJ Moleküle wurde schließlich das Konzept von barriere- und porenbildenden Claudine aufgestellt, welches spätestens nach der Charakterisierung von Claudin 2 als parazelluläre Pore weitreichende Akzeptanz in der wissenschaftlichen Welt fand (18, 79). Allerdings ist an dieser Stelle zu unterstreichen, dass sich das Konzept der Poren- und Barriereclaudine als komplex erweist und nur unter bestimmten Einschränkungen Gültigkeit besitzt: Streng genommen können nämlich alle Claudine als barrierebildend betrachtet werden, da selbst die Überexpression von porenbildenden Claudinen in einem Zellverband ohne TJ immer zu einer Erhöhung des transzellulären Widerstandes und damit zu einer Barrierebildung führt (80). Der Grund hierfür ist, dass eine durchlässige parazelluläre TJ-Barriere im Vergleich zum Fehlen jeglicher TJ bekanntlich immer noch einen größeren Widerstand aufweist und damit verminderte Permeabilitätseigenschaften mit sich bringt. Demgegenüber führt die Expression von "porenbildenden" Claudinen in einem dichten Epithel zum Einbau der Porenclaudine in die TJ bzw. zur Modifizierung der Eigenschaften der bereits bestehenden TJ Stränge. Dies wiederum hat eine relative Zunahme der Permeabilität und damit der transepithelialen Flüsse zur Folge. Es ist daher essentiell bei der Verwendung des Begriffspaares der Barriere- bzw. Porenclaudine immer deren relativen Charakter im Auge zu behalten (80). Zudem haben zahlreiche Studien gezeigt, dass gewisse Claudine nicht einfach nur unspezifische parazelluläre Kanäle bilden, sondern in der Regel auch eine besondere Ladungs- und Größenselektivität aufweisen (81-84). Die Komplexität des Porenkonzepts wird noch weiter dadurch gesteigert, dass die Ausbildung von bestimmten parazellulären Poren die Interaktion von unterschiedlichen Claudine voraussetzt. Aufgrund der bereits bekannten Barriere bzw. Poreneigenschaften von einigen Claudinen wäre es an dieser Stelle natürlich verlockend, die Claudin Expression in einem Gewebe zu untersuchen um davon dann direkte Schlüsse auf die parazellulären Permeabilitätseigenschaften des Epithels zu ziehen. Die Realität gestaltet sich allerdings als weitaus komplexer: Seit der Erstbeschreibung der Claudine als TJ Moleküle gab es unzählige Studien, in denen die Claudin Expression in verschiedensten Geweben erfasst wurden. In besonderem Fokus stand dabei beispielsweise die Charakterisierung der Claudin Expression im Verdauungstrakt, den Nieren, verschiedenen Drüsenorganen oder dem

Innenohr und wurde in den letzten Jahren auch in zahlreichen Reviews diskutiert (80, 85) Hierbei wird deutlich, dass in den meisten Geweben in der Regel deutlich mehr als 5 Claudine zum Teil in unterschiedlichen Quantitäten gleichzeitig exprimiert werden. Aufgrund der Kombinatorik alleine ergibt sich schon hier eine enorme Anzahl an möglichen Claudin-Interaktionen, sodass eine exakte Vorhersage bezüglich den parazellulären Permeabilitätseigenschaften mit Einschränkungen und zum Teil nur mit großer Unsicherheit getroffen werden kann. Eine Vorhersage wird noch dadurch erschwert, dass in Abhängigkeit vom Entwicklungs- und Differenzierungsstadium sowie der exakten Lokalisation von Zellen selbst innerhalb eines Gewebeverbandes signifikante Unterschiede in der Claudin Expression sowie der subzellulären Claudin Lokalisation vorherrschen können. Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass für Erfassung der parazellulären Eigenschaften weit mehr als das alleinige Spektrum der exprimierten Claudine ausschlaggebend ist. Vielmehr sollten zahlreiche weitere Faktoren wie beispielsweise das quantitative Verhältnis der exprimierten Claudine zueinander, mögliche Interaktionen, posttranslationale Modifizierungen oder auch die subzelluläre Lokalisation in der Beurteilung ihre Berücksichtigung finden.

#### 1.4.3 TJ und Claudine im ES

Intensive Studien zu TJ in endolymphatischen Epithelien wurden vor allem in den 1980er Jahren von Rask-Andersen mittels elektronenmikroskopischer Techniken durchgeführt (22, 23, 35, 86). Bereits damals wurde einerseits gezeigt, dass der ED vor allem „seichte“ (leaky) TJ und eine erhöhte Durchlässigkeit gegenüber Schwermetallionen aufweist. Beispielsweise konnte mittels Lanthanum-Injektionen in die Endolymphe von Meerschweinchen über TEM Studien nachgewiesen werden, dass diese Schwermetallionen über die TJ des ED in den periduktalen Interzellularraum diffundieren können. Im Gegensatz dazu konnten aber die TJ des ES eine effiziente Barriere gegenüber dem Lanthanum darstellen, sodass kaum ein Übertritt von Schwermetallionen aus dem Lumen in den Interzellularraum mittels TEM detektierbar war (23). Passend zu diesen Daten demonstrierten Studien mittels elektronenmikroskopischer Analysen von Gefrierbrüchen, dass in der PSP nur eine relativ geringe Komplexität und Menge an TJ Strängen vorliegt. Demgegenüber wurden die ISP und DSP mit deutlich komplexeren TJ Netzwerken zwischen benachbarten Zellen beschrieben (22).



Diese Daten legen daher nahe, dass sich der ED und die PSP möglicherweise durch eine höhere parazelluläre Durchlässigkeit auszeichnen als die ISP und DSP. Seit der Entdeckung der Claudine als molekulare Komponenten der TJ wurden allerdings nur sehr wenige Studien zu diesem Thema in den endolymphatischen Epithelien durchgeführt. Eine Microarray-Genexpressionsanalyse konnte zeigen, dass Claudin 3, 4, 8, 10, 16 im ES im Vergleich zum umgebenden meningealen Gewebe spezifisch exprimiert werden (24). Eine weitere Studie konnte mittels RT-PCR und *In-Situ* Hybridisierung die Claudin-mRNA von 2, 4, 6, 7, 9, 11, 12 und 14 im ES nachweisen (25). Zusammenfassend muss hier aber festgestellt werden, dass die parazellulären Permeabilitätseigenschaften des ED und ES, die molekulare Basis der in den 1980er Jahren beobachteten Unterschiede der Ultrastruktur der TJs im ED und ES und die Rolle der Claudine bei diesen Prozessen allerdings bis heute nur sehr unzureichend verstanden sind.

## 1.5 Fragestellungen, Zielsetzungen und die Durchführung des Projekts

### 1.5.1: Ultrastrukturelle Unterschiede der TJ im ED und den verschiedenen Abschnitten des ES der postnatalen Tag 4 (P04) Ratte

Daten aus den 1980er Jahren zeigen, dass sich nicht nur das ultrastrukturelle Erscheinungsbild von TJs im ES und ED in Komplexität und Menge der TJ Stränge deutlich unterscheidet, sondern dass auch funktionelle Unterschiede bei den TJs von ES und ED beispielsweise in Bezug auf ihre parazelluläre Durchlässigkeit gegenüber Schwermetallionen vorhanden sind (22, 23). Das erste Ziel im Rahmen dieser Studie bestand somit darin, Daten zum ultrastrukturellen Erscheinungsbild von TJs im ES und ED mittels transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Studien zu reproduzieren und im Rahmen einer feinen Differenzierung zwischen unterschiedlichen ES Abschnitten noch weiter auszubauen. Weiter stellte sich die Frage wie das an der Volumenregulation des ES beteiligte Endothel der den ES begleitenden Kapillaren aufgebaut ist und ob sich bezüglich der Lokalisation am ED oder ES morphologische Unterschiede zeigen. Insgesamt sollten dabei folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- a) Gibt es TJs zwischen allen Zelltypen bzw. unterscheiden sich diese je nach beteiligten Zelltypen?
- b) Wie unterscheiden sich die TJ in den unterschiedlichen ES und ED Abschnitten?

### 1.5.2: Identifizierung von Claudinen in der Ratte (P04 und P31), die auf mRNA Ebene in endolymphatischen Geweben exprimiert werden

Bislang existieren kaum Daten, die die molekularen Bausteine der TJs im ES und ED beleuchten sowie eine Erklärung zu den in den 1980er Jahren beschriebenen Unterschieden des ultrastrukturellen Erscheinungsbildes von TJ im ES und ED liefern. Da die Claudine mit ihren knapp 30 Familienmitgliedern als entscheidende Komponenten des molekularen Aufbaus von TJ sowie des parazellulären Flüssigkeits- und Ionentransports beschrieben wurden (14, 66, 80), wurde im folgenden Schritt ein Hochdurchsatz quantitativer RT-PCR- Screen zur Identifizierung der im Epithel des ED und ES exprimierten Claudine angesetzt. Speziell waren hier folgende Fragen von Relevanz:

- a) Welche Claudine werden im Epithel des ES und ED auf mRNA Ebene exprimiert?
- b) Gibt es Unterschiede in der Claudin mRNA Expression zwischen dem Epithel des ED und ES?
- c) Gibt es Unterschiede zwischen den postnatalen Tag 4 (P04) ES und den nur schwer zugänglichen adulten ES Proben (P30)?

### 1.5.3. Zelluläre Analyse der Claudin Protein Expression in Häutchenpräparaten des ED und ES der Ratte (P04)

Wie in zahlreichen Studien gezeigt, korreliert die mRNA Expression häufig nicht mit der tatsächlichen Proteinexpression (87, 88). Folgende Fragestellungen wurden daher in diesem Abschnitt mittels Immunfluoreszenzmikroskopie behandelt:

- a) Werden die auf mRNA identifizierten Claudine auch auf Proteinebene exprimiert?
- b) Gibt es Expressionsunterschiede sowie Unterschiede in der zellulären Lokalisation zwischen ED und ES und in unterschiedlichen Bereichen des ES?

### 1.5.4. Subzelluläre Analyse der Claudin Protein Expression in Kryoschnitten des ED und ES der juvenilen Ratte (P04) im Vergleich zum ES der hörreifen, adulten Ratte (P30)

Folgende Fragestellungen wurden in diesem Abschnitt mittels konfokaler *laser scanning* Mikroskopie (LSM) behandelt:

- a) Welche subzelluläre Lokalisation haben die unterschiedlichen Claudine im Epithel des ED und ES?
- b) Gibt es Zelltypen, die bestimmte Claudine stärker exprimieren?
- c) Werden die im juvenilen ES (P04) identifizierten Claudine auch in den schwerer zugänglichen funktionell hörreifem, adulten ES (P30) exprimiert?

#### 1.5.5. Pharmakologische Stimulationen des ED und ES der Ratte (P04) mit dem V2R-spezifischen ADH-Analog 1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin (dDAVP)

Verschiedene Studien haben eine Assoziation zwischen dem MM bzw. dem endolymphatischen Hydrops (89) und ADH Blutspiegeln gezeigt. Tierexperimentelle Studien haben zudem demonstriert, dass die kontinuierliche Applikation von ADH zu einer Dysregulation der Ionen- und Flüssigkeitshomöostase im Innenohr und damit zu einer Menière'schen Symptomatik führen kann (4, 30). Im Speziellen wurden in dieser Studie deshalb folgende Fragestellungen bearbeitet:

- a) Hat ADH, über den V2R, einen Einfluss auf das ultrastrukturelle Erscheinungsbild von TJs in TEM Aufnahmen im ES und ED?
- b) Gibt es Claudine, die durch ADH auf mRNA Ebene reguliert werden?
- c) Gibt es Claudine, deren subzelluläre Lokalisation im ES durch ADH reguliert wird?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere und Gewebspräparation:

Wistar Ratten wurden bei "Charles River Laboratories" (Sulzfeld, Deutschland) mit einem Alter von 4 Tagen bezogen. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Anatomischen Institutes in einem 12h Tag/ Nacht Zyklus gehalten und mit Standard Pellet Diät versorgt. Für die Gewinnung der ES Präparate wurden die Tiere in einem Entwicklungsstadium p04 oder als adulte Tiere p31 nach CO<sub>2</sub>-Betäubung enthauptet, der Schädelknochen sagittal gespalten und anschließend das Gehirn entnommen. So war es möglich, Zugang zum Schläfenbein und der posterioren, kranialen Fossa zu erlangen, sodass der ES inklusive dem ED sehr vorsichtig herauspräpariert und von anhaftendem meningealen Gewebe befreit werden konnte. In kaltem PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (Sigma Aldrich, D8537) wurden der ES und ED mit einer feinen Schere getrennt. Umgebendes perisakkuläres Gewebe (ST), welches Meningen, Bindegewebe und Blutgefäße umfasste und eine Expression von TJ Molekülen aufweist, wurde als Kontrollgewebe verwendet. Die Verwendung der Tiere für diese Organentnahmen wurde vom Regierungspräsidium Stuttgart genehmigt (Tieranzeige Organentnahme vom 05.06.2014)

### 2.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

ES und ED Gewebspräparationen wurden für einen Tag fixiert (1% OsO<sub>4</sub> in 0,1M cacodylate puffer pH 7.4) und 3-mal für jeweils 10 min gewaschen (0,145M cacodylate buffer pH 7.4). Das Einbetten erfolgte zuerst durch Dehydrierung der Präparate mit einer Behandlung mit ansteigenden Ethanolkonzentrationen (2 mal 10 min 50% ethanol, 2 mal 10 min 70% Ethanol, über Nacht gesättigtes Uranylacetat in 75% Ethanol, 3 mal 20 min 100% Ethanol, 3 mal 20 min Aceton). Im Anschluß wurden die Proben mit ansteigenden Konzentrationen von Propylenoxid behandelt (10 min Propylenoxid (1:3), 30 min Epon Propylenoxid (3:1), 30 min Epon Propylenoxid (1:1), 60 min Epon Propylenoxid (3:1), 90 min reines Epon). Die Polymerisation erfolgte über einen Zeitraum von 3 Tagen bei einer Temperatur von 55°C. Das Epon hierfür wurde mit 25% MNA, 25% DDSA, 48,8% Epon and 1,2% DMP-30 hergestellt. Ultradünnschnitte (80 nm) wurden mit einem "Reichert Ultracut" Microtom generiert und mittels einem LEO EM 912 Omega Transmission Elektronenmikroskop unter einer Betriebsspannung von 80

kV analysiert. Die Bilder wurden mit einer 1K GrabBit Proscan Kamera aufgenommen und mit der "analySIS" oder Image SysProg Software prozessiert.

### 2.3 RNA Isolierung aus Gewebeproben und deren Analyse mittels RT-PCR und qPCR (High Performance qPCR Fluidigm System)

ES, ED oder ST Proben von bis zu 12 Ratten wurden jeweils in 2 mL collection Tubes mit 1.4 & 2.8 mm beads gepoolt und die RNA mit dem Precellys Tissue RNA Kit (PeqLab: 12-7621-00) entsprechend der Anweisung des Herstellers isoliert. Der „on membrane“ Verdau von kontaminierender gDNA auf den RNA Aufreinigungssäulen wurde mit dem peqGOLD DNase I Digest Kit (PeqLab, 12-1091-02) durchgeführt. Die RNA Konzentration wurde mittels Qubit® RNA HS Assay Kit (Life Technologies: Q32852) gemessen und die Proben auf eine Konzentration von 20 ng/uL verdünnt.

Die RT-PCR für die Claudin 10a und 10b Isoform Detektion wurde mit dem cDNA Synthese Kit H Plus von PeqLab (Cat. No 03 – 2040) und der TaqDNA Polymerase von PeqLab (Cat. No 01 – 1020) durchgeführt. Die RT-PCRs wurden bei insgesamt 2,5ng cDNA pro Reaktion über 38 Zyklen laufen gelassen (Denaturierung: 95°C für 30 Sekunden, Annealing: 58°C für 30 Sekunden; Elongation: 72°C für 60 Sekunden). Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenz: Cldn10a links: 5'-TTTGTGGGAGTCCTGTCCAG-3' und rechts 5'-CCACACACCAGAGCTGAGAT-3'; Cldn10b links 5'-AGGACTTCCCCTCCATGCT-3' und rechts 5'-ACCGCGGCAATCATTAGTC-3'. Im Folgenden wurden die Cldn10 Isoform spezifischen PCR Produkte auf einem 1,75% Agarose Gel analysiert.

Für die Analyse des Claudin Transkriptoms von ES und ED Epithelien mittels qPCR wurde in einem ersten Schritt eine Reverse Transkription der gewonnenen RNA der ES, ED und ST Proben mit dem Cells Direct Kit (Invitrogen: No 11753-100) durchgeführt. Dazu wurden 20 ng der isolierten RNA in 9 uL Präamplifikationsmix (5 µL 2x RXN Direct Buffer, 1.3 µL TE Buffer pH 7.0, 2 µL Superscript III, 2.5 µL von 1:100 verdünnten 20x TaqMan Sonden) transferiert, um ein finales Volumen von 10 µL zu erhalten. Die Reverse Transkription wurde im Anschluß für 15 min bei 50° C durchgeführt (VWR Doppio Thermal Cycler). Die daraus generierte cDNA wurde mit 18 PCR Zyklen präamplifiziert (15 Sek bei 95° C und 4 min bei 60° C) und das Präamplifikat 1:5 mit TE Buffer verdünnt. Von diesem wurden 2.7 µL zu 3.3 µL Sample Mix (3 µL Universal PCR Master Mix with no Emperase (Applied Biosystems: No 4324018) und 0.3

Tabelle 1 - TaqMan Sonden - qPCR

Claudin 1 - Cldn1 - Rn00581740_m1	Claudin 7 - Cldn7 - Rn01496517_g1	Claudin 14 - Cldn14 - Rn01407193_m1	Claudin 20 - Cldn20 - Rn01430561_s1
Claudin 2 - Cldn2 - Rn02063575_s1	Claudin 8 - Cldn8 - Rn01496517_g1	Claudin 15 - Cldn15 - Rn04244372_m1	Claudin 22 - Cldn22 - Rn03416360_s1
Claudin 3 - Cldn3 - Rn00581751_s1	Claudin 9 - Cldn9 - Rn01460292_s1	Claudin 16 - Cldn16 - Rn00590884_m1	Claudin 23 - Cldn23 - Rn01482199_s1
Claudin 4 - Cldn4 - Rn01196224_s1	Claudin 10 - Cldn10 - Rn01468224_m1	Claudin 17 - Cldn17 - Rn01771991_s1	Claudin 24 - Cldn24 - Rn01487934_s1
Claudin 5 - Cldn5 - Rn01753146_s1	Claudin 11 - Cldn11 - Rn00584941_m1	Claudin 18 - Cldn18 - Rn01447445_m1	Pendrin - Sc126a4 - Rn01469208_m1
Claudin 6 - Cldn6 - Rn01464110_m1	Claudin 12 - Cldn12 - Rn04219013_m1	Claudin 19 - Cldn19 - Rn01416537_m1	
Referenz Gene:	UBC - Rn01789812_g1	TBP - Rn01455646_m1	

$\mu$ L GE Sample Mix (Applied Biosystems: PN 85000746) hinzugefügt. Parallel dazu wurden die 20x TaqMan Probes (Tabelle 1) jeweils mit 2x Assay Reagent (Applied Biosystems: PN 85000736) 1:2 verdünnt. Im Anschluß daran wurden die Präamplifikate und verdünnten TaqMan Probes auf einer Fluidigm qPCR Platte (Biomark TM, 48.48 Dynamic Array™) geladen und eine High Performance qPCR Analyse durchgeführt. Die Daten wurden mit der BioMark Data Collection Software gesammelt und die *cycle threshold* -(Ct) Werte in Excel transferiert.

#### 2.4 Claudin mRNA Expressionsanalyse von stimulierten Einzelpräparaten

Nach der Präparation wurden die ES Präparate in DMEM Medium mit 1  $\mu$ M dDAVP (Bachem), 10 mM dcAMP (Millipore), 10mM Forskolin (Millipore) bzw. 1  $\mu$ M H9400 (Bachem) bei 37°C für 3h im Brutkasten inkubiert. Anschließend wurden die Einzelsäcke in 10  $\mu$ L Preamplifikationsmix (5  $\mu$ L 2x RXN direct buffer, 1.3 $\mu$ L TE buffer pH 7, 0.2  $\mu$ L Superscript III, 2.5  $\mu$ L der 1:100 verdünnten 20x Assays (TaqMan Sonden) in TE-buffer) transferiert und eine reverse Transkription mit dem Cells Direct Kit (Invitrogen: No 11753-100) für 15 min bei 50°C durchgeführt (VWR Doppio Thermal Cycler). Die daraus generierte cDNA wurde mit 18 PCR Zyklen präamplifiziert (15 Sek bei 95° C und 4 min bei 60° C) und das Präamplifikat 1:5 mit TE Buffer verdünnt. Von diesem wurden 2.7  $\mu$ L zu 3.3  $\mu$ L Sample Mix (3  $\mu$ L Universal PCR Master Mix with no Emperase (Applied Biosystems: No 4324018) und 0.3  $\mu$ L GE Sample Mix (Applied Biosystems: PN 85000746)) hinzugefügt. Parallel dazu wurden die 20x TaqMan Probes (Tabelle 1) jeweils mit 2x Assay Reagent (Applied Biosystems: PN 85000736) 1:2 verdünnt. Im Anschluß daran wurden die Präamplifikate und verdünnten TaqMan Proben auf einer Fluidigm qPCR Platte (Biomark TM, 48.48 Dynamic Array™) geladen und eine High Performance qPCR Analyse durchgeführt. Die Daten wurden mit der BioMark Data Collection Software gesammelt und die Ct Werte in Excel transferiert.

Tabelle 2 - Antikörper - Immunfluoreszenz Mikroskopie

Claudin 3, anti-rabbit, 1:100, Life Technologies	Claudin 7, anti-rabbit, 1:100, IBL International	Claudin 16, anti-rabbit, 1:100, Invitrogen
Claudin 4, anti-rabbit, 1:100, Life Technologies	Claudin 8, anti-rabbit, 1:100, Life Technologies	ZO-1, anti-mouse, 1:100, Life Technologies
Claudin 6, anti-rabbit, 1:100, IBL International	Claudin 10, anti-rabbit, 1:100, Invitrogen	
Sekundärer Antikörper: Donkey anti-rabbit Alexa 546, 1:400, Invitrogen		

## 2.5 qPCR Daten Auswertung

Die normalisierten relative Quantitäten (NRQ) Werte von den einzelnen ES-ST und ED-ST Paaren wurden nach einer modifizierten und verbesserten  $\Delta\Delta C_t$  Methode berechnet (90). Die Normalisierung erfolgte dabei gegen die beiden Haushaltsgene UBC und TBP. Die ermittelten NRQs wurden zur Erstellung eines Box Blots verwendet.

## 2.6 Immunfluoreszenz Mikroskopie

Präparierte ES Proben wurden mit 4% Paraformaldehyd für 30 min fixiert und 3 mal mit PBS ohne  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  (Sigma Aldrich, D8537) gewaschen. Für die Färbungen von Häutchenpräparaten wurden die fixierten ES Proben inklusive daran assoziierten ED mit Permeabilisierungspuffer PP (0.25% Triton X-100 in PBS) für 5 min inkludiert und 3 mal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluß wurden die ES Proben mit Blockierungs Puffer (BP) (0.1% Triton X-100, 1% NDS) für 30 min transferiert und über Nacht bei 4°C in Reaktionspuffer (RP) (0.1% NDS in PBS) mit dem primären Antikörper (Tabelle 2) inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die ES jeweils für 5 min 3 mal gewaschen und dann in RP mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 2) transferiert. Nach 3 maligem Waschen mit PBS für jeweils 10 min wurden die Säcke auf einen Glasträger aufgebracht und in FluorSave Tm (Calbiochem) eingebettet. Die Analyse erfolgte dann mittels Weitfeld Fluoreszenzmikroskopie (ApoTome, Zeiss) und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie. (cLSM) (LSM 510 Meta, Zeiss).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von ES und ED Proben der P04 Ratte

Ultradünnschnitte von ES und ED Proben der p04 Ratte wurden mittels Transmissionselektronen Mikroskopie (TEM) analysiert, um die ultrastrukturelle Morphologie der TJ im ES und ED untersuchen und vergleichen zu können. Es wurden im Allgemeinen sehr gut erhaltene Gewebeproben mit minimalen Fixierungsartefakten gewonnen (Abbildung. 1). Die TEM Analyse des ED zeigte ein kuboidales Epithel mit einem hohen Anteil an Zellen reich an Ribosomen (RRLC). Diese waren durch junctionale Komplexe verbunden, die Desmosomen und „seichte“ TJ mit einer geringen Anzahl an „Berührungspunkte“ beinhalteten (Abbildung 1A). Bei einigen dieser Schlussleistenkomplexe schienen diese Berührungspunkte benachbarter Membranen gar zu fehlen (Abbildung. 1A'). Zusätzlich konnten auch prominente Invaginationen der subepithelialen Lamina propria in das ED Epithel beobachten werden, die sich zum Teil fast bis zu den apikalen Membranen der ED Zellen erstreckten. Ein dichtes Netzwerk an kontinuierlichen Gefäßen mit Endothelzellen, die durch prominente TJ miteinander verbunden waren, lag unmittelbar unterhalb der Basalmembran des ED. Das Epithel der PSP bzw. ISP zeichnete sich im Gegensatz zum ED mit den MRCs und RRCs mit insgesamt 2 unterschiedlichen Zelltypen aus. Zwischen allen möglichen Zellkombinationen konnten Schlussleistenkomplexe mit TJs beobachtet werden, so zwischen MRC – MRC, MRC-RRC oder RRC – RRC Zellpaaren (Abbildung. 1B). Diese TJ waren komplex aufgebaut und durch multiple „Berührungspunkte“ charakterisiert (Abbildung 1B'). In der distalen ES (DSP) dominierten die RRCs als der vorherrschende Zelltyp (Fig. 1C). Auch hier waren zwischen allen Zellen TJ zu finden, die multiple „Berührungspunkte“ der benachbarten Zellmembranen aufwiesen (Abbildung 1C'). Sowohl in der PSP als auch in der DSP schien genau wie im Bereich des ED das subepitheliale Endothel kontinuierlich zu sein (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass TJ im ED trotz deutlicher Variation im Vergleich zum ES Epithel insgesamt seichter erschienen und eine geringere Anzahl von membranären Berührungspunkten aufwiesen.

#### 3.2: Hochdurchsatz qPCR: Claudin mRNA Expression in p04 und p30 ES bzw. ED Proben

Um jene Moleküle zu identifizieren, die die parazellulären Barriereigenschaften des ES und ED mitbestimmen, wurde das Claudin Transkriptom mit einem qPCR



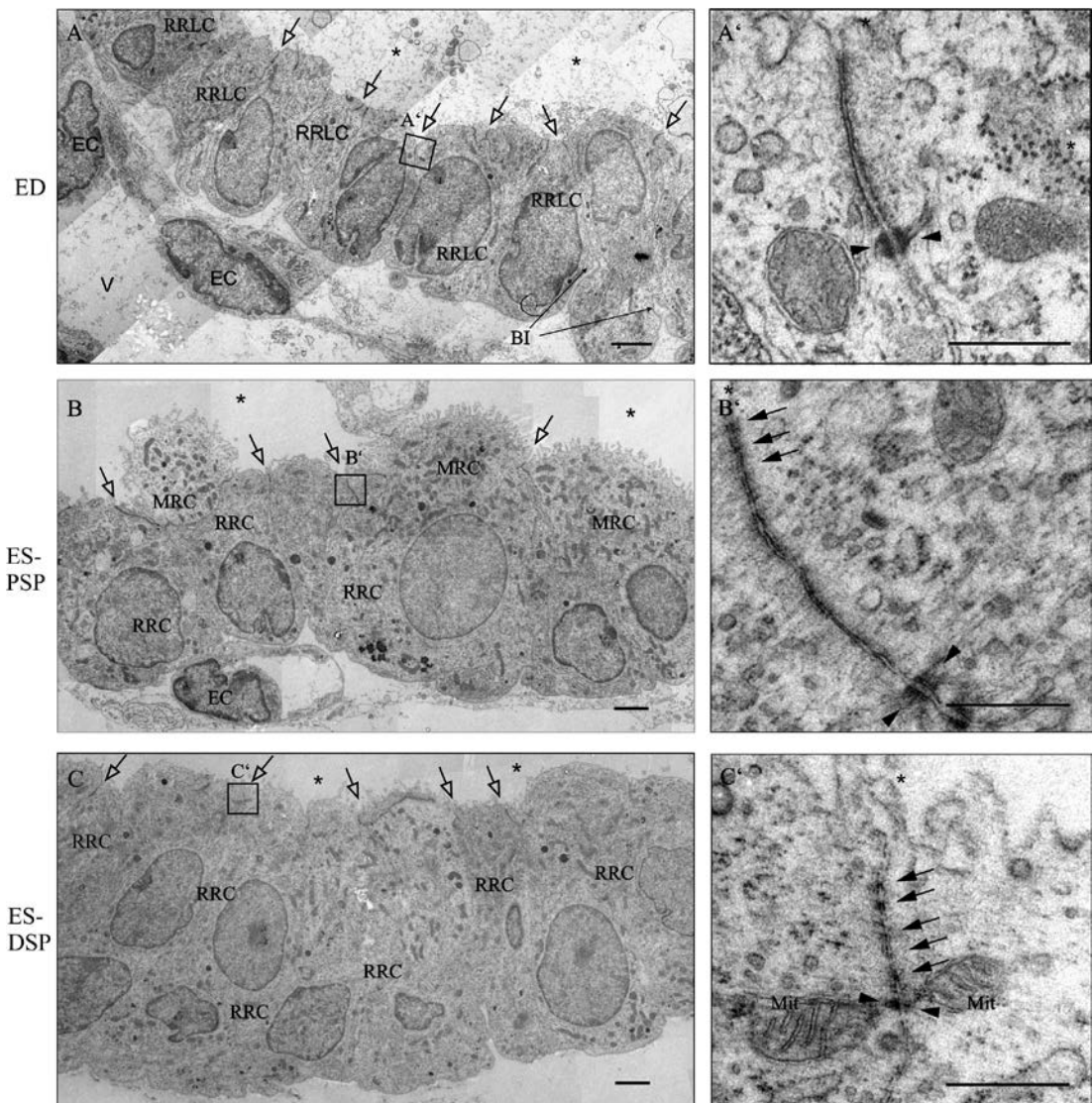


Abbildung 1: TEM Analyse der endolymphatischen Epithelien des ED, der PSP und DSP. (A) ED Epithel mit kuboidalen Zellen, die über junctionale Komplexe (weiße Pfeile) mit einander in Verbindung stehen. Blutgefäß (V) im subepithelialen Bindegewebe. (A') Vergrößerung des in A umrahmten Ausschnitts mit einem junctionalen Komplex des ED mit einem Desmosom (schwarze Pfeilspitzen) aber ohne deutliche membranäre Berührungspunkte. (B) PSP Epithel mit Zellen des MRC und RRC Typs, die alle über junctionale Komplexe verbunden sind. (B') Vergrößerung des in B umrahmten Ausschnitts eines langen junctionalen Komplexes mit einigen membranäre Berührungspunkten (schwarze Pfeile) und 2 Desmosomen. (C) DSP mit Zellen vor allem des RRC Typs, die über junctionale Komplexe in Verbindung stehen. (C') Vergrößerung des in B umrahmten Ausschnitts eines junctionalen Komplexes zwischen 2 Zellen des RRC Typs, der zumindest 5 membranäre Berührungspunkte und ein Desmosom aufweist. BI: Basale Invaginationen. EC: Endotheliale Zelle. BM: Basale Membran. Maßstab: A – C: 2 µm; A' – C' 500 nm

Screen analysiert. Da das ST aufgrund von endothelialen und meningealen TJ bereits eine signifikante Claudin Expression aufweist (91), wurde die ES und ED Claudin Expression relativ zum ST erfasst. Es konnten Claudin 3, 4, 6, 7, 10, 16, 17 und 22 als jene Vertreter identifiziert werden, die eine deutlich höhere - daher spezifische

Expression - in ES und ED Epithelien im Vergleich zum ST aufwiesen und eine normalisierte relative Quantität (NRQ) von 10 oder mehr zeigten (Abbildung. 2A). Der NRQ wurde dabei willkürlich bei 10 oder größer 10 fixiert, damit die im ES spezifisch exprimierten Claudine identifiziert werden konnten. Die meisten der identifizierten Claudine mit Ausnahme von Claudin 17 und 22 waren zudem auf mRNA Ebene mit einem Faktor von 2 bis 5 stärker im ES exprimiert verglichen zum ED. Demgegenüber zeigten Claudin 5, 11 und 19 eine stärkere Expression im ST verglichen zu den untersuchten endolymphatischen Epithelien (Abbildung 2A, Tabelle 3). Die mRNAs von Claudin 2, 14 und 18 konnten hingegen weder im ED und ES noch in ST Proben in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 2A, Tabelle 3). Mittels RT-PCR konnte im Falle von Claudin 10 noch weiter zwischen den beiden Isoformen Claudin 10a und 10b differenziert werden. Es konnte die Claudin 10b mRNA sowohl im ES als auch ED nachgewiesen werden (Abbildung 2B). Claudin 10a hingegen lieferte in keiner Probe ein Signal. In der p04 Nierenprobe, die als Postivkontrolle eingesetzt wurde, konnte hingegen die Expression von beiden Isoformen nachgewiesen werden (Fig. 2B). Im folgenden Schritt wurden die Ct Werte des qPCR Screens herangezogen, um die absolute Claudin mRNA Expression in ES, ED und ST Proben annähernd abschätzen zu können. Ct Werte beschreiben die Menge an Zyklen, die notwendig sind, damit in einer qPCR ein entsprechender Schwellenwert des Fluoreszenzsignals erreicht wird. Ist viel Ausgangs RNA vorhanden, so sind wenig PCR Zyklen zum Erreichen des Schwellenwerts notwendig und der Ct Wert dementsprechend gering. Bei wenig RNA sind die Ct Werte dann demgegenüber hoch oder sehr hoch. In unserer Studie wurden Zielmoleküle mit einem Ct Wert zwischen 14 und 17 Zyklen wurden als moderat exprimiert eingestuft. Claudine mit Ct Werten oberhalb von 17 wurden demgegenüber als schwach oder sehr schwach bewertet. Lagen die Ct Werte jedoch unterhalb von 14 Zyklen so wie unsere House Keeping oder Referenzgene, so wurde die Claudine als stark oder sehr stark exprimiert eingeordnet (Tabelle 3). Für die folgenden Untersuchungen wurden nur jene Claudine herangezogen, die die beiden folgenden Bedingungen erfüllten: Claudine sollten erstens eine spezifische Expression in den untersuchten p04 endolymphatischen Epithelien mit einem NRQ von 10 oder mehr verglichen mit dem ST aufweisen. Zweitens wurde gefordert, dass die mit dieser Methode abgeschätzte absolute Claudin Expression mindestens auf einem moderaten Niveaus liege. Claudin 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 16 erfüllten diese beiden Bedingungen und wurden daher für die weitere Untersuchung und Charakterisierung herangezogen. Sehr ähnliche Ergebnisse wie oben beschrieben wurden auch bei der Analyse des

Tabelle 3 - Abgeschätzte absolute Claudin mRNA Expression - qPCR

Gen	ED	ES	ST	Gen	ED	ES	ST	Gen	ED	ES	ST	Gen	ED	ES	ST
Claudin 1	+	++	+	Claudin 7	++	+++	+	Claudin 14	n.d.	n.d.	n.d.	Claudin 20	++	++	++
Claudin 2	(+)	(+)	(+)	Claudin 8	+++++	+++++	++	Claudin 15	+	+	+	Claudin 22	+	+	++
Claudin 3	+++	++++	+	Claudin 9	+	+	(+)	Claudin 16	++	+++	+	Claudin 23	+	+	+
Claudin 4	+++	++++	+	Claudin 10	+++++	+++++	++	Claudin 17	++	++	(+)	Claudin 24	+	+	+
Claudin 5	+	+	++	Claudin 11	++++	+++	++++	Claudin 18	n.d.	n.d.	n.d.	Pendrin	+++	+++++	++
Claudin 6	+++	++++	+	Claudin 12	+	++	+	Claudin 19	(+)	(+)	++	UBC	++++	++++	++++

$ct \leq 11$ : +++++ Sehr starke Expression     $14 < ct \leq 17$ : +++ Moderate Expression     $20 < ct \leq 24$ : ++ Sehr geringe Expression    n.d.: Keine Detektion  
 $11 < ct \leq 14$ : ++++ Starke Expression     $17 < ct \leq 20$ : ++ Geringe Expression     $ct > 24$ : (+) Extrem geringe Expression

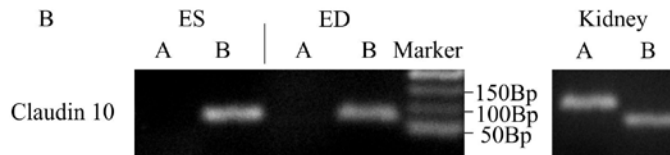
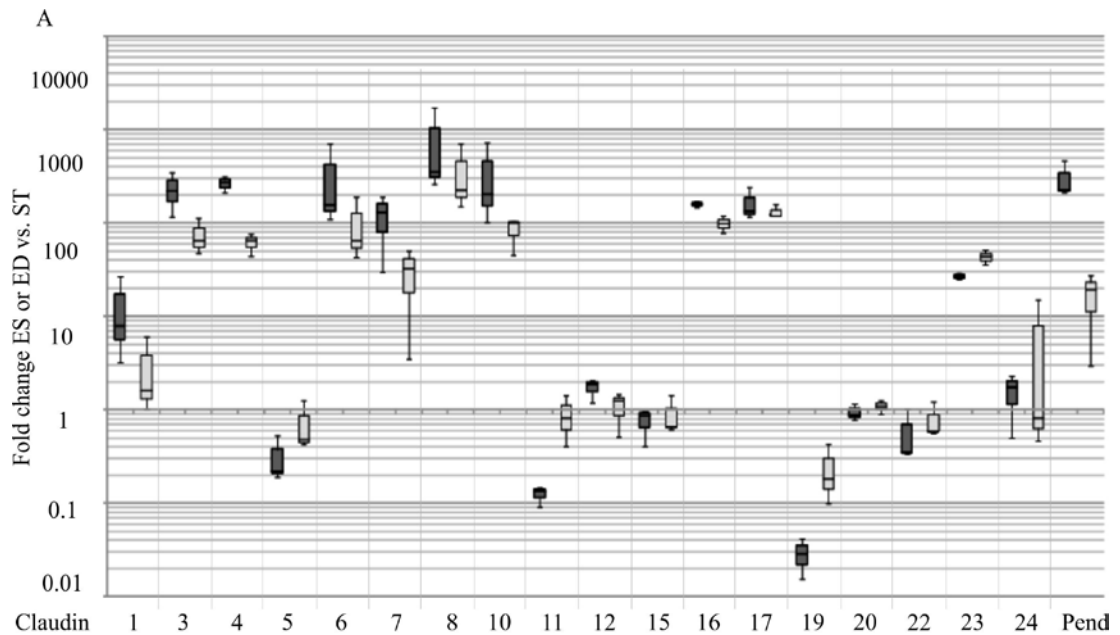


Abbildung 2: (A) ST zeigte in den qPCR Studien eine Claudin mRNA Expression vermutlich der kapillären oder meningealen TJ. Daher wurde die relative Claudin mRNA Expression des ES (schwarze Balken) und des ED (hellgraue Balken) mit dem perisakkulären bzw. periduktalen ST verglichen, um die für endolymphatische Epithelien spezifischen Claudine zu identifizieren: Claudin 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 16 zeigten eine spezifische Expression in endolymphatischen Geweben und einen NRQ von 10 oder mehr im Vergleich zum ST. Nicht gezeigte Claudine waren ohne nennenswerte Expression im ED oder ES (n=3). Pen: Pendrin. (B) Durchführung einer RT-PCR zur Identifizierung der Claudin 10 Isoformen im ED und ES: Nur die Expression der Claudin Isoform 10b konnte im ED und ES detektiert werden. Niere als positiv Kontrolle zeigte sowohl Claudin 10a als auch 10b Expression. Länge der PCR Produkte: Claudin 10a: 120 Bp. Claudin 10b: 70 Bp.

Tabelle 4 - Eingeschätzte absolute Claudin Expression in P30 Proben - qPCR

Gen	ES + ST	ST	Gen	ES + ST	ST	Gen	ES + ST	ST	Gen	ES + ST	ST
Claudin 1	++	++	Claudin 7	+++	+	Claudin 14	n.d.	n.d.	Claudin 20	+++	+++
Claudin 2	(+)	(+)	Claudin 8	+++++	++	Claudin 15	++	++	Claudin 22	+++	+++
Claudin 3	+++++	++	Claudin 9	++	+	Claudin 16	+++	(+)	Claudin 23	+	+
Claudin 4	+++++	++	Claudin 10	+++++	++	Claudin 17	++	+	Claudin 24	++	++
Claudin 5	++	++	Claudin 11	++++	++++	Claudin 18	n.d.	n.d.	Pendrin	+++++	++
Claudin 6	+++++	++	Claudin 12	++	++	Claudin 19	(+)	(+)	UBC	+++++	+++++

ct ≤ 11: +++++ Sehr starke Expression    14 < ct ≤ 17: +++ Moderate Expression    20 < ct ≤ 24: ++ Sehr geringe Expression    n.d.: Keine Detektion  
 11 < ct ≤ 14: ++++ Starke Expression    17 < ct ≤ 20: ++ Geringe Expression    ct > 24: (+) Extrem geringe Expression

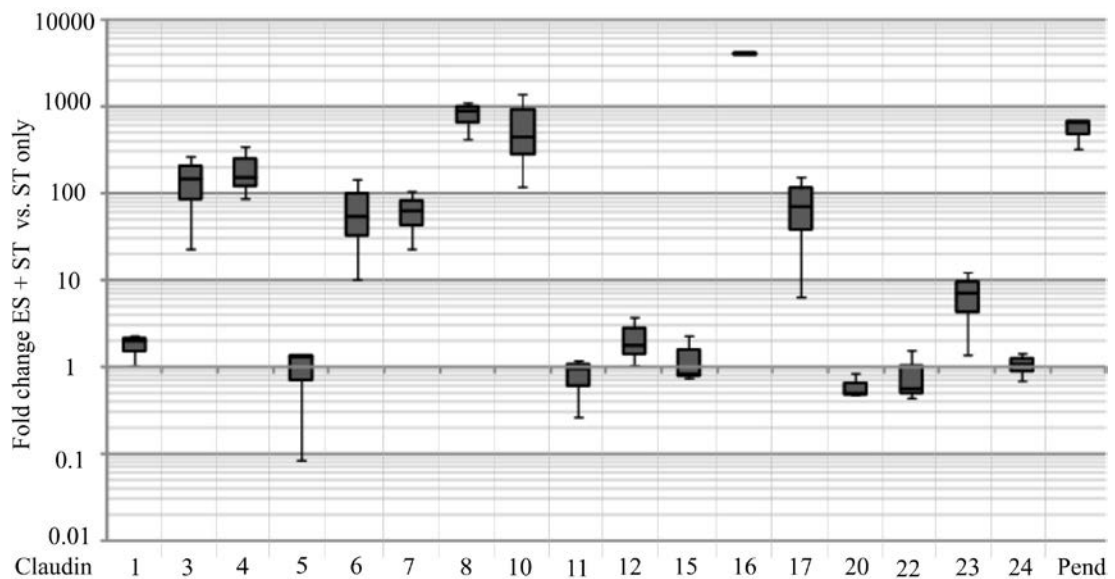


Abbildung 3: Analog dem Vorgehen in Abbildung 2 wurde die relative Claudin mRNA Expression des adulten p30 ES durch Vergleich mit dem perisakkulären ST erfasst: Nachweis von Claudin 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 16 mRNA Expression in adulten endolymphatischen Epithelien mit einem NRQ von 10 oder mehr im Vergleich zum ST. Nicht gezeigte Claudine ohne nennenswerte Expression im ED oder ES. n=3. Pen: Pendrin.

Claudin Transkriptoms in adulten p30 ES Proben gewonnen, die oft sehr stark mit dem umgebenden meningealen Gewebe verwachsen sind und daher häufig einen hohen Grad an ST Kontamination aufweisen. Daher wurde hier ES gemeinsam mit anhaftendem ST mit ST alleine verglichen. (Abbildung 3, Tabelle 4). Anzumerken ist an dieser Stelle, dass bei adulten p30 Tieren aufgrund der anatomischen Gegebenheiten auch keine separaten ED präpariert werden konnten so wie dies im Alter von 4 Tagen postnatal möglich ist. Dementsprechend finden sich auch keine ED Proben bei der Analysen der p30 Proben.

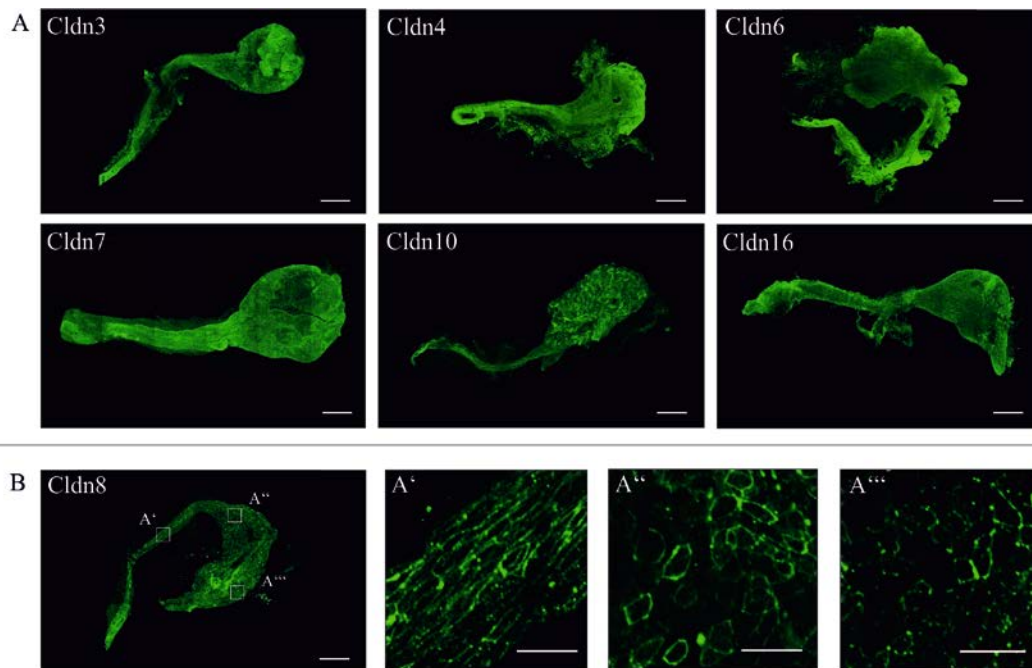
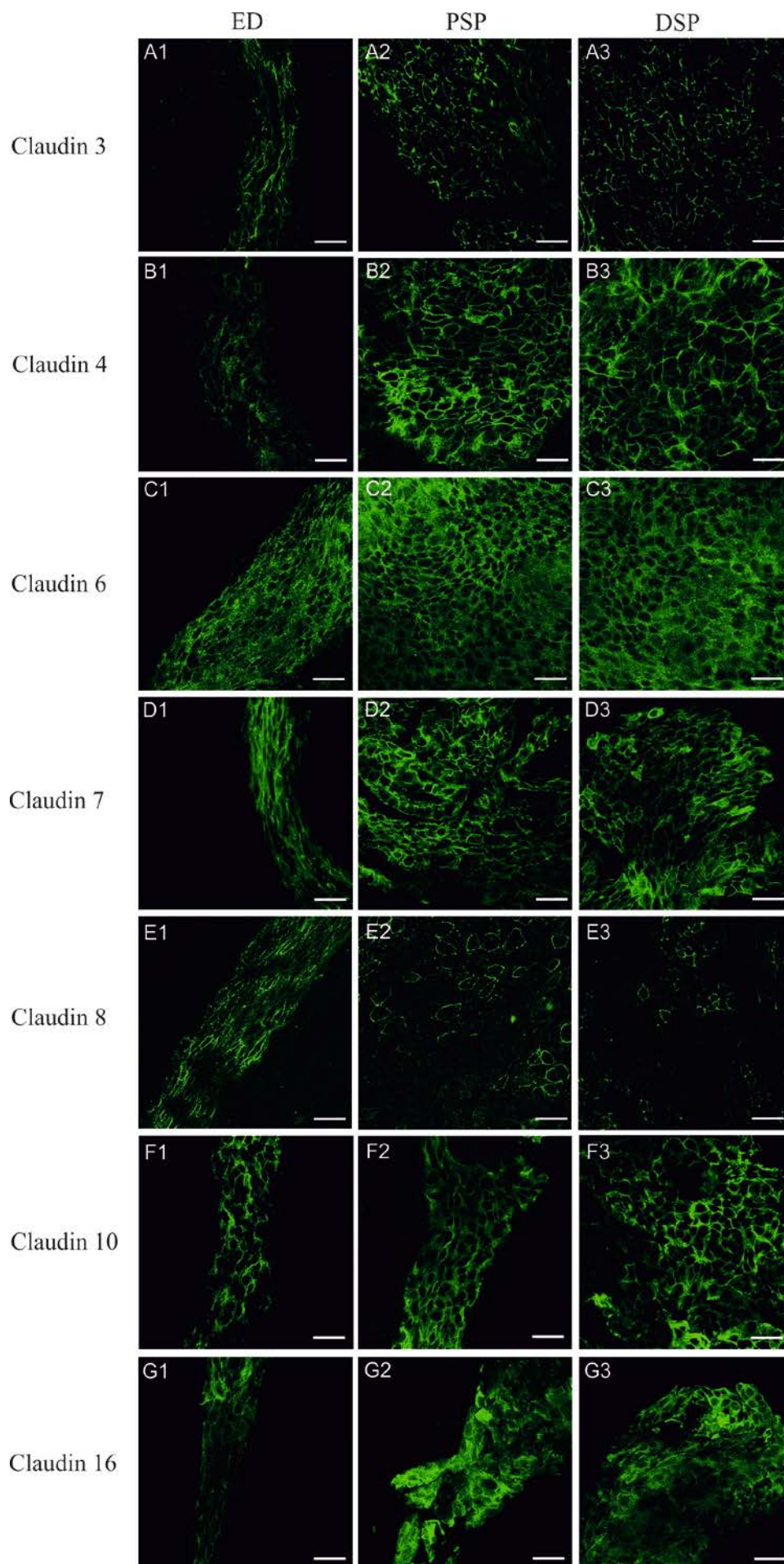


Abbildung 4: Übersichtsaufnahmen einer Weitfeld-immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse von ES Häutchenpräparaten mit daran assoziiertem ED: (A) Detektion von Claudin 3, 4, 6, 10 und 16 Proteinexpression gleichmäßig in allen Teilen des ES und ED. (B) Proteinexpression von Claudin 8 regelmäßig zwischen allen Zellen im Bereich des ED (B') sowie beschränkt auf bestimmte Zellen in der PSP (B'') oder DSP (B'''). Maßstab in den Übersichtsaufnahmen: 200  $\mu$ m sowie in B' – B''': 20  $\mu$ m.

### 3.3 Zelluläre Lokalisation von Claudinen in p04 Häutchenpräparaten

Im nächsten Schritt wurde eine Weitfeldimmunfluoreszenz Mikroskopie (Abbildung 4) und cLSM-Analyse (Abbildung 5) an Häutchenpräparaten des ES mit daran assoziiertem ED durchgeführt, um die Expression der ausgewählten Claudine auf Proteinebene zu bestätigen und zwischen unterschiedlichen Teilen des ES zu vergleichen. Tatsächlich konnte die Proteinexpression von Claudin 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 16 in ES und ED Epithelien bestätigt werden, während im Gegensatz dazu das ST kein nennenswertes Signal lieferte (Abbildung 4 und 5). Claudin 8 war dabei das einzige dieser untersuchten Claudine, das eine Zelltyp-spezifische Expression aufwies und in der PSP bzw. DSP sehr scharf an den Grenzen von ganz bestimmten Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 4B, A'' – A'''). Demgegenüber konnte ein scharf begrenztes Signal über den ganzen ED hinweg an den Zellgrenzen identifiziert werden (Abbildung 4B, A').





- ▲ Abbildung 5: cLSM Analyse von gefärbten ES Häutchenpräparaten mit daran assoziiertem ED. (A) Claudin 3, (C) Claudin 6, (D) Claudin 7 bzw. (F) Claudin 10 mit gleichmäßiger Proteinexpression in allen Bereichen und in allen Zellen des ES bzw. ED. Quantitative Unterschiede der (B) Claudin 4 bzw. (G) Claudin 16 Expression mit deutlich stärkerem Signal im ES im Vergleich zum ED. (E) Claudin 8 Protein Expression detektierbar als feine Linien zwischen allen Zellen im ED und nur an Zellgrenzen von einigen bestimmten Zellen im Bereich der PSP sowie DSP. Maßstab: 20 µm.

Stapelanalyse mittels LSM erhärtete schließlich eine Lokalisation von Claudin 8 in den TJ (Daten nicht gezeigt). Die Immunfluoreszenz Mikroskopie brachte weitere Unterschiede in der quantitativen Expression von bestimmten Claudinen im ED und ES Epithel zu Tage. Claudin 4 und 16 zeigten insgesamt ein relativ schwaches Signal im ED während die Expression in den übrigen Bereichen des ES auf einem sehr hohen Niveau zu sein schien (Abbildung 5 B & G). Bei den anderen Claudinen 3, 6, 7 und 10 konnten jedoch keine Unterschiede in der quantitativen Proteinexpression erfasst werden (Abbildung 5 A, C, D & F).

#### 3.4. Subzelluläre Lokalisation von Claudinen in Kryoschnitten des p04 ED und ES

Um nun die subzelluläre Lokalisation der selektierten Claudine speziell im Kontext zu TJ zu ermitteln, wurden Schnitte von ED und ES Proben und Doppelfärbungen mit den selektierten Claudinen und dem TJ Marker ZO-1 angefertigt. Claudin 3 wurde als einziges Claudin identifiziert, das Unterschiede in der subzellulären Claudin Lokalisation aufwies (Abbildung 6): Im ES Epithel war Claudin 3 vor allem mit ZO-1 gemeinsam in den TJ zu finden wobei nur ein geringerer Teil als zytoplasmatische Fraktion vorlag (Abbildung 6B). Im ED war demgegenüber vor allem eine basolaterale Claudin 3 Lokalisation zu beobachten und nur ein kleinerer Teil des Claudin 3 Signals konnte in den TJ mit ZO-1 kolokalisiert werden (Abbildung 6A). Im Gegensatz dazu wurden bei den anderen Claudinen keine signifikanten Unterschiede in der subzellulären Lokalisation beobachtet (Abbildung 7 & 8): Claudin 7 war basolateral in allen Teilen des ED und ES lokalisiert und nur ein kleiner Teil konnte mit ZO-1 in TJ lokalisiert werden. Claudin 10 lieferte zwar ein starkes basolaterales Signal, dennoch konnte auch ein signifikanter Anteil gemeinsam mit ZO-1 in den TJ sowohl im ES als auch ED vorgefunden werden. Überraschenderweise waren die anderen selektierten Claudine 4, 6 und 16 sowohl im ES als auch ED hauptsächlich im Zytoplasma verteilt – nur ein geringerer Anteil konnte in den Membranen oder in den TJ lokalisiert werden. Die Unterschiede in der quantitativen Protein Expression von Claudin 4 und 16, die zuvor schon in der Immunfluoreszenz Mikroskopie von Kompletpräparaten beobachtet werden konnte,

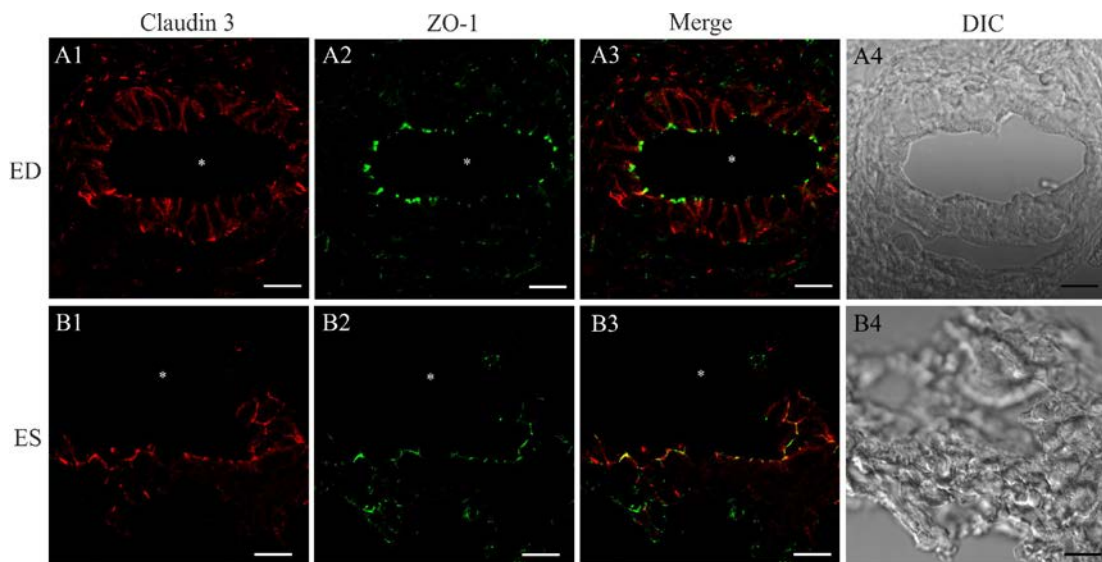


Abbildung 6: Detektion der subzellulären Claudin 3 Expression in ED und ES Kryschnitten mittels cLSM Analyse: (A) Deutliche basolaterale Lokalisation von Claudin 3 mit nur geringer ZO-1 Kolokalisation in ED Epithelien. (B) Signifikante Kolokalisation von Claudin 3 mit ZO-1 in den TJ des ES Epithels. Maßstab 10 µm.

konnten auch hier bei der Analyse von Schnittpräparaten bestätigt werden: Claudin 4 und 16 lieferten nur ein sehr schwaches Signal in ED Schnitten während im ES eine starke zytoplasmatische Expression detektiert werden konnte. Die Claudin 6 Färbungen hingegen zeigten sowohl quantitativ als auch subzellulär in Abhängigkeit der Lokalisation des ED oder ES keine Unterschiede. Für Claudin 8 allerdings konnten hier leider keine Daten gewonnen werden, da die verfügbaren Antikörper an den Kryschnitten kein verwertbares Signal sondern nur unspezifischen Background lieferten (Daten nicht gezeigt). Um nun eine Expression der selektierten Claudine auch auf Proteinebene in adulten ES Epithelien zu bestätigen, wurden p30 ES Schnitte mit Doppelfärbungen für die selektierten Claudine und ZO-1 angefertigt. Die anschließende LSM Analyse der Proben lieferte die gleichen Ergebnisse wie die Analyse der p04 Proben (Abbildung 9). An dieser Stelle kann also zusammengefasst werden, dass die Expression von allen im qPCR Screen ausgewählten Claudinen auf Proteinebene in der Immunfluoreszenzmikroskopie in p04 und adulten Proben bestätigt werden konnte. Eine differentiell regulierte subzelluläre Lokalisation wurde nur für Claudin 3 nachgewiesen. Bei Claudin 4 und 16 konnten hingegen vor allem Unterschiede in der absoluten Protein Expression in ED und ES Epithelien identifizieren werden während die Claudin 8 Analyse sogar Hinweise auf eine Zelltyp spezifisch Expression lieferte.



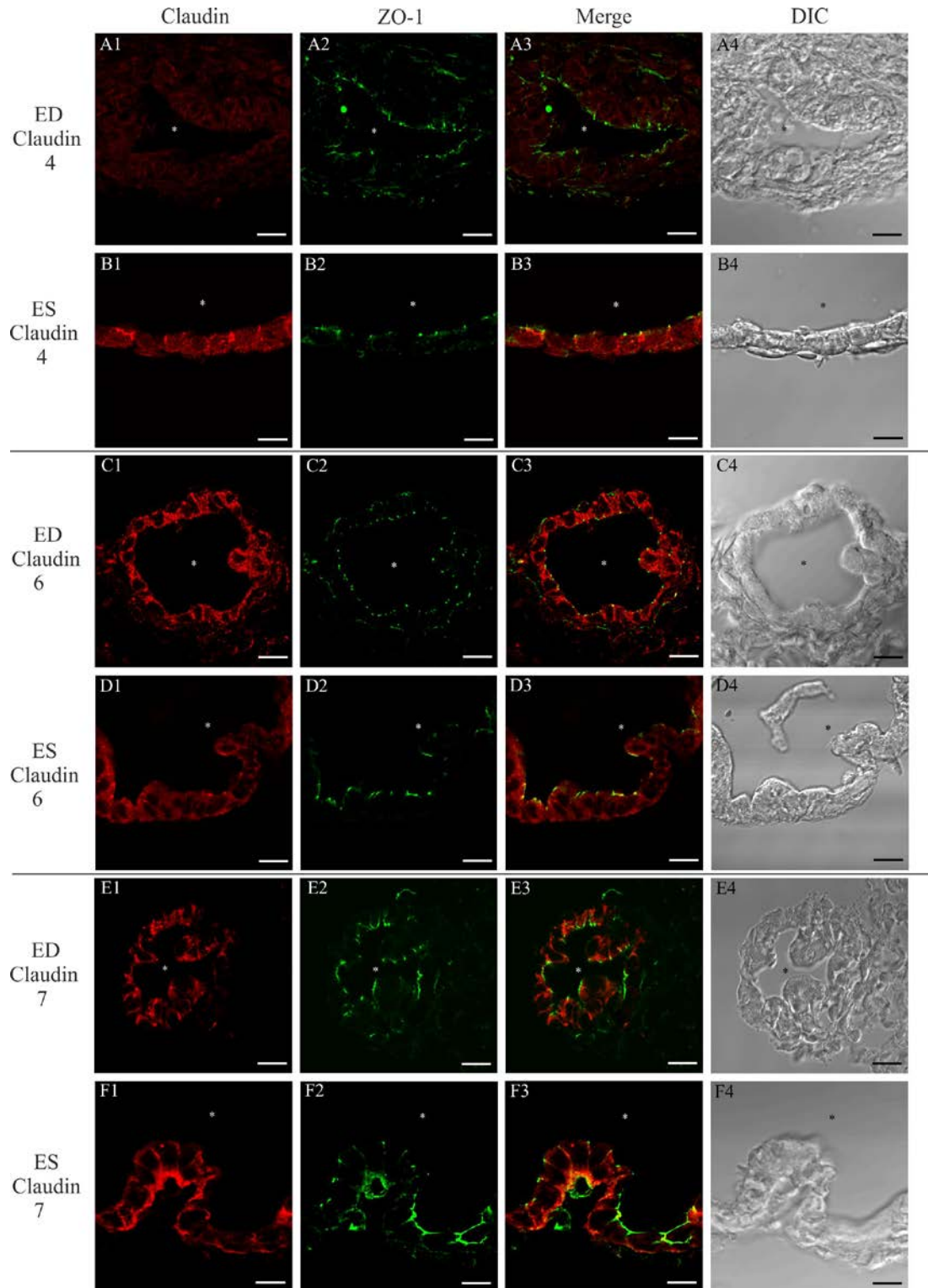


Abbildung 7: Detektion der subzellulären Lokalisation von Claudin 4, 6 & 7 in ED und ES Kryoschnitten mittels cLSM Analyse: (A, B) Zytoplasmatische Expression von Claudin 4 in ED und ES Epithelien. Im Gegensatz zum ES lieferte der ED allerdings kaum ein Signal. (C, D) Gleichmäßige zytoplasmatische Expression von Claudin 6 in ES und ED Epithelien. (E, F) Gleichmäßige basolaterale Lokalisation von Claudin 7 in ES und ED Epithelien. Maßstab 10 µm.

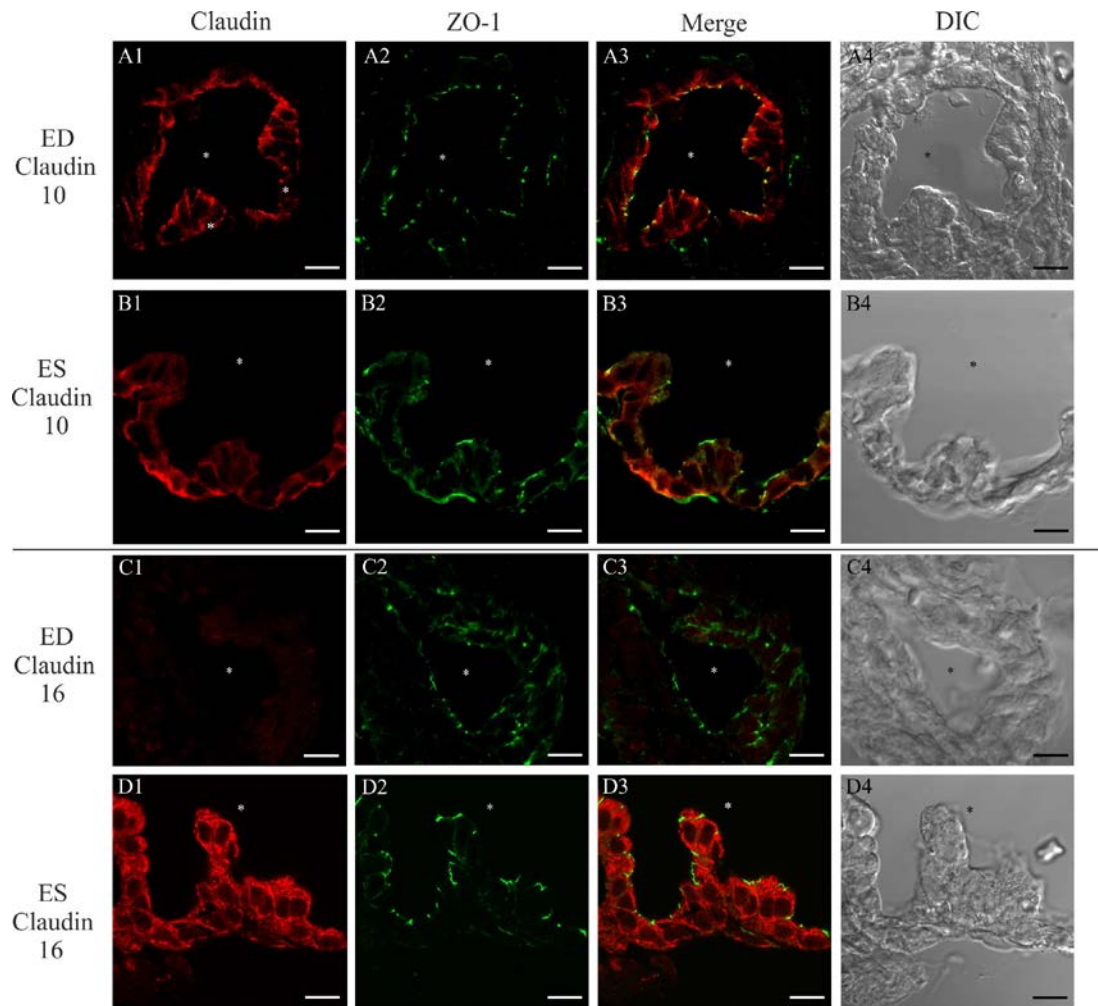


Abbildung 8: Detektion der subzellulären Lokalisation von Claudin 10 & 16 in ED und ES Kryschnitten mittels cLSM Analyse: (A, B) Gleichmäßige basolaterale Lokalisation von Claudin 10 in ED und ES Epithelien, wobei auch ein signifikanter Anteil mit ZO-1 kolokalisiert werden konnte. (C, D) Zytoplasmatische Expression von Claudin 16 in ED und ES Epithelien. Im Gegensatz zum ES lieferte der ED allerdings kaum ein Signal für Claudin 16. Maßstab 10 µm.

### 3.5 Regulierbarkeit der mRNA Expression und subzellulären Lokalisation von Claudinen im ES Epithel der p04 Ratte

Es ist hinreichend bekannt, dass ADH seine Wirkung unter anderem über die cAMP/PKA- Signalkaskade entfaltet (44). Um den Effekt von ADH und Aktivatoren der PKA-Signalkaskade auf die Claudin Transkription zu untersuchen, wurden in einem Pilotexperiment jeweils 3 -5 einzelne ES mit Forskolin (FSK), einem Aktivator der Adenylatzyklase, dem cAMP Analogon dibutyryl cAMP oder mit dDAVP für 3h in

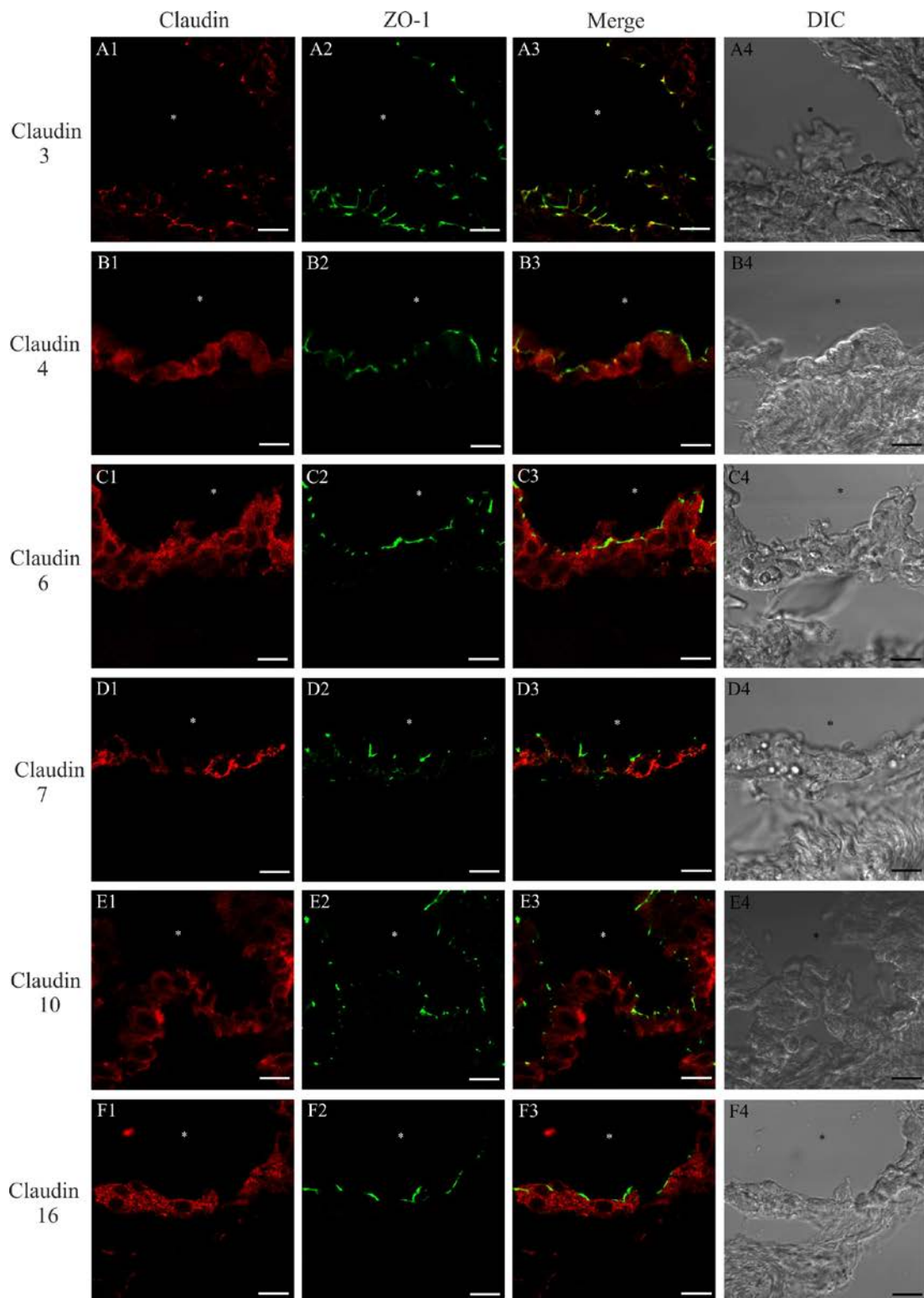


Abbildung 9: Detektion der subzellulären Lokalisation der Claudine 3, 4, 6, 7, 10 und 16 in Kryoschnitten von adulten ES Proben mittels cLSM Analyse: (A) Signifikante Kolokalisation von Claudin 3 mit ZO-1 in den TJ des ES Epithels. (B) Claudin 4 mit zytoplasmatischer und membranärer Lokalisation sowie Kolokalisation mit ZO-1 in den TJ. (C, E, F) Zytoplasmatische Expression von Claudin 6, 10 und 16 sowie (D) basolaterale Expression von Claudin 7 ohne Kolokalisation mit ZO-1. ST ohne unspezifische Färbung. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

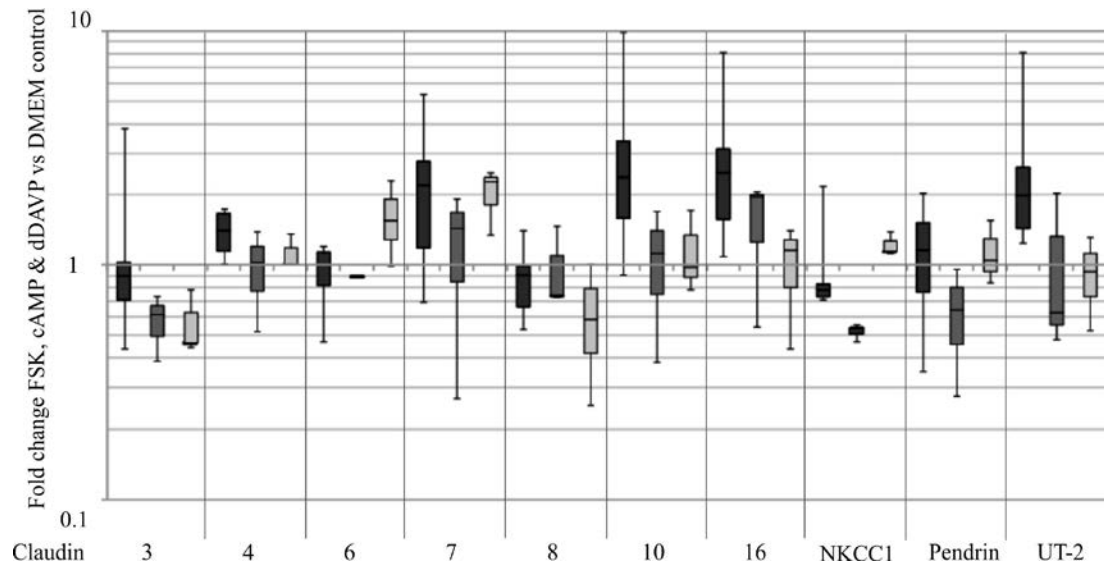


Abbildung 10: Stimulation von einzelnen ES Präparaten mit Forskolin (FSK, schwarze Balken, n = 5), dibutyryl cAMP (dcAMP graue Balken, n = 3) oder dDAVP (hellgraue Balken, n = 3) für 3h. Analyse der Claudin mRNA Expression mittels qPCR in den stimulierten ES Präparaten und Ermittlung der relativen Expression im Vergleich zu den Kontrollpräparaten, die für 3h in reinem DMEM Medium inkubiert wurden.

DMEM Medium stimuliert. Im Folgenden wurde mit dem Hochleistungs-qPCR System Fluidigm die Claudin mRNA Expression der einzelnen stimulierten ES analysiert und mit der von Kontroll-Einzelsäcken, die in DMEM ohne pharmakologische Stimulierung der cAMP-Signalkaskade inkubiert wurden, verglichen (Abbildung 10). Bei FSK konnte eine geringe Induktion der Claudine 7, 10 und 16 sowie des Kontrollgenes UT-2 beobachtet werden. Die anderen Claudine und auch die Kontrollgene NKCC1 und Pendrin zeigten trotz Stimulation hingegen eine annähernd unveränderte mRNA Expression. Demgegenüber hatte das Pharmakon Dibutyryl cAMP ähnlich wie dAVP keinen nennenswerten Effekt auf die mRNA Expression der untersuchten Claudin- sowie der Kontrollgene. Aufgrund des nur sehr gering ausgeprägten Effektes von FSK bzw. des Fehlens einer deutlichen Induktion einer Claudin mRNA Expression in den dDAVP inkubierten ES Proben wurde der weitere Fokus auf die Untersuchung der Proteinexpression und die subzelluläre Claudin Lokalisation im stimulierten ES Epithel gelegt. Dazu wurden Gewebsschnitte von stimulierten ES angefertigt und die Proteinexpression sowie die subzelluläre Lokalisation der PKA regulierten Claudine 4 und 16 in der Immunfluoreszenz konfokal mikroskopisch analysiert. H9400, ein Hemmer der durch dDAVP aktivierbaren V2R Rezeptoren, wurde im Rahmen der Negativkontrollen eingesetzt. Claudin 4 zeigte in H9400 behandelten ES so wie auch in den nativen Säcken (Abbildung 7) eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation

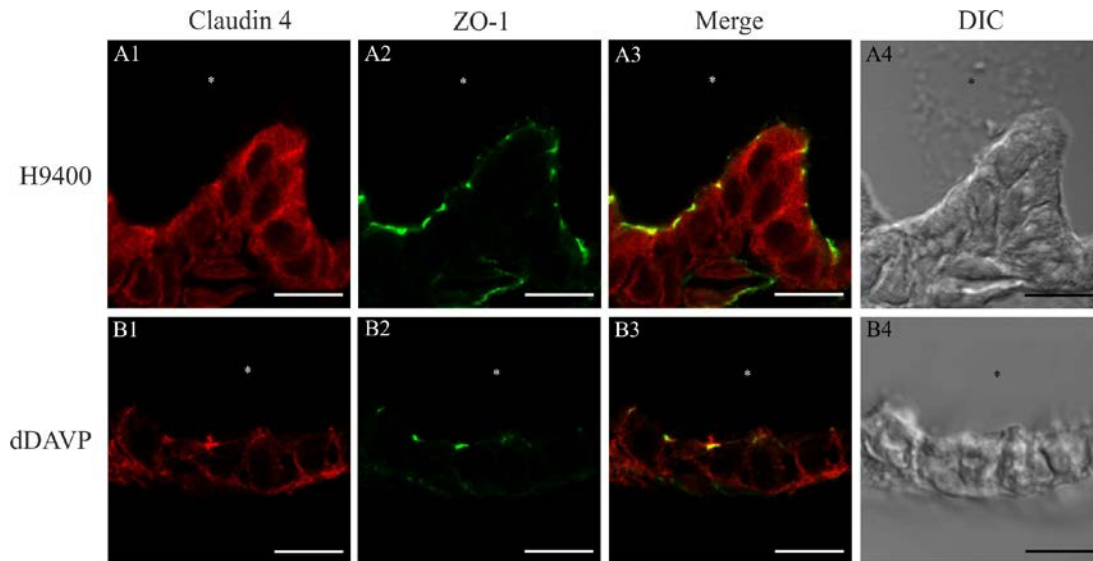


Abbildung 11: Detektion der subzellulären Lokalisation von Claudin 4 im Epithel von (A) mit H9400 geblockten oder (B) mit dDAVP stimulierten ES Präparaten mittels cLSM Analyse. Im Gegensatz zu den H9400 geblockten ES Epithelien konnte in dDAVP stimulierten Proben eine deutliche Claudin 4 Translokation in die membranären Kompartimente bzw. in die TJ beobachtet werden. Maßstab 5  $\mu$ m.

wobei nur ein geringer Anteil des Signales in den Membranen sowie TJ lokalisierbar war (Abbildung 11). In dDAVP behandelten ES zeigte sich eine deutliche Translokation von Claudin 4 in die Membranen und in die TJ zu erkennen. Bei Claudin 16 hingegen konnte kein Effekt von dDAVP auf die subzelluläre Lokalisation beobachtet werden – sowohl im stimulierten ES Epithel als auch in den Kontrollen war eine zytoplasmatische Lokalisation vorherrschend (Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifizierung von Claudin Molekülen im ED und ES

Seit mehr als drei Jahrzehnten werden die Abschnitte des Endolymphraums, in denen die Sekretion und Resorption der Endolymphe und damit die Erhaltung der Ionen- und Flüssigkeitshomöostase des Innenohrs stattfindet, erforscht (2). Neben der *Stria cochlearis* des *Ductus cochlearis* scheint dabei vor allem der ED und ES eine zentrale Stellung einzunehmen (2, 4, 92). Allerdings konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, an welchen exakten Abschnitten des endolymphatischen Epithels des ES und ED die Ionen und Flüssigkeitshomöostase der Endolymphe reguliert wird (3). Elektronenmikroskopische Gefrierbruchanalysen von Rask Andersen und seinem Team in den frühen 1980er Jahren beobachteten vor allem im ED und in den proximalen Anteilen des ES seichte und weniger komplex aufgebaute TJ (22, 86). Diese Gefrierbruchanalysen legten bereits damals die Möglichkeit nahe, dass die Resorption der Endolymphe vor allem im ED sowie der PSP erfolgen könne. Die in dieser Arbeit durchgeführten transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten die früheren Gefrierbruchanalysen des ED- und ES-Epithels: Im ED zeigten sich vorwiegend seichte TJ mit keinen oder nur wenigen „Berührungspunkten“, während vor allem in distalen ES Abschnitten komplexere TJ mit deutlich mehr „Berührungspunkten“ beobachtet werden konnten (Fig.1). Die Beobachtungen waren jedoch mit einer deutlichen Variabilität verbunden, wodurch – wenn auch in geringerem Ausmaß – sogar im Dukt komplexere TJ detektiert werden konnten. Abgesehen von den Studien, die die ultrastrukturelle Morphologie der TJ im ED und ES Epithel beleuchten, gibt es nach unserem Wissenstand bisher kaum Studien, die weitere Details sowie das molekulare Korrelat der beobachteten TJ Unterschiede in den verschiedenen Abschnitten des endolymphatischen Epithels erfassen. Um dies näher zu charakterisieren, wurde ein qPCR Screen zur Identifizierung der im ED- und ES-Epithel exprimierten TJ Moleküle, der Claudine, durchgeführt. Es zeigte sich dabei eine starke und spezifische Expression von Claudin 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 16, die somit für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurden (Fig. 2). Es ist jedoch wichtig an dieser Stelle herauszustreichen, dass auch die Expression von Claudin 1, 12, 15, 17, 20, 23 und 24 auf mRNA nachgewiesen werden konnte. Diese erfüllten allerdings nicht die beiden für diese Arbeit festgelegten Kriterien in Bezug auf relative und absolute Quantitäten und wurden daher nicht weiter untersucht: Beispielsweise konnte eine 8 fach stärkere mRNA Expression von Claudin 1 im ES Epithel im Vergleich zum ST bei insgesamt geringer absoluter Quantität beobachtet werden. Trotz dieser geringen relativen und absoluten Expression kann aber eine essentielle Rolle von Claudin 1 oder von anderen von der



Liste gestrichenen Claudinen bei der endolymphatischen Ionen und Flüssigkeitshomöostase nicht ausgeschlossen werden. Weiteres konnten im qPCR Screen auch Claudine wie Claudin 5, 11 und 19 identifiziert werden, die eine starke mRNA Expression im ST im Vergleich zu den untersuchten endolymphatischen ES- und ED- Epithelien zeigten. Erklärbar erscheint dies durch meningeale und endotheliale TJ im ST, die selber eine sehr charakteristische Expression von TJ Molekülen wie zum Beispiel Claudin 5 besitzen (91). Es konnte allerdings keine nennenswerte mRNA Expression weder des klassischen porenbildenden Claudin 2, noch der Claudine 14 und 18 nachgewiesen werden. Diese in dieser Studie erhobenen Daten stimmen mit einer erst kürzlich veröffentlichten Microarray Studie überein, die bereits die mRNA Expression von Claudin 3, 4, 8, 10 und 16 in Ratten ES Gewebe zeigte (24). Die im folgenden Schritt mittel immunohistochemischer Analyse gezeigte Expression der Claudin Proteine im ES und ED bestätigten die qPCR Ergebnisse. Darüber hinaus zeigte die subzelluläre Analyse mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie eine sehr spezifische Expression der ausgewählten Claudine in den untersuchten ED- und ES-Epithelien (Abbildung 6, 7 & 8) und lieferte damit erstmals auch mögliche Erklärungen für die ultrastrukturellen Unterschiede der TJ im ED- und ES Epithel (Abbildung 1): So haben zahlreiche Studien Claudin 3, ein essentielles Claudin der Blut -Hirn sowie Blut-Hodenschranke (93, 94), als ein starkes parazelluläres Barrieremolekül für geladene und ungeladene Moleküle identifiziert. In elektronenmikroskopischen Analysen von Gefrierbrüchen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Claudin 3 mit einer deutlichen Zunahme der Menge und der Komplexität von TJ Strängen einhergeht. Damit verbunden war auch eine starke Zunahme der epithelialen Barriere gegenüber geladenen und ungeladenen Teilchen (17). In Übereinstimmung damit konnte mittels Claudin 3 Knock-Down Experimenten die parazelluläre Permeabilität von epithelialen Zellschichten in vitro wie beispielsweise bei MDCK Zellkulturen signifikant erhöht werden (95, 96). Im ED konnte in der vorliegenden Studie hauptsächlich eine basolaterale Lokalisation von Claudin 3 detektiert werden und nur ein kleinerer Anteil war in den TJ mit ZO1 kolokalisiert (Abbildung 6). Dies könnte daher eine Erklärung für die reduzierte Anzahl und Komplexität an Versiegelungssträngen in der ED-Region liefern und somit ein Indiz für eine höhere parazelluläre Permeabilität des ED darstellen. Demgegenüber wurde Claudin 3 im ES Epithel vor allem mit ZO-1 in den TJ ko-lokalisiert (Fig. 5), eine Beobachtung, die möglicherweise die Basis für die multiplen membranären „Berührungspunkte“ der TJ im ES darstellt (Abbildung 1C). Die anderen in dieser Studie untersuchten Claudine hingegen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der subzellulären Lokalisation zwischen ED und verschiedenen ES-Regionen,

sondern in der Quantität der mRNA- und der Protein Expression. Claudin 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 16 fanden sich auf mRNA-Ebene um den Faktor 2 bis 5 geringer im ED exprimiert als im ES-Epithel. Auf Proteinebene zeigte sich in der Immunfluoreszenzanalyse der Kryoschnitte für Claudin 4 und 16 deutlich geringere Signale im ED Epithel im Vergleich zu den distalen Abschnitten des ES. Somit könnten diese Unterschiede in der Quantität der exprimierten Claudine eine weitere Erklärung für eine geringere Anzahl an TJ Strängen und eine geringere parazelluläre Barriere im ED liefern. Die Theorie eines „Leaky Ducts“ und eines „Tighten Sacs“ kann zudem durch eine Reihe weiterer publizierter Daten und Indizien erhärtet werden, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen: Bereits in den frühen 1980er Jahren wurden Experimente mit dem Schwermetall Lanthanum durchgeführt, das bei Ratten über das runde Fenster direkt in die Endolymphe injiziert wurde (23). Mittels folgender TEM Analyse konnten Lanthanum-Präzipitate im ED-Epithel identifiziert werden, die sich in die interzellularen Regionen sowie bis in das periduktale Gewebe erstreckten. Dies deutete auf eine höhere parazelluläre Permeabilität des ED-Epithels zumindest für Schwermetallionen hin. Im Gegensatz dazu konnten Lanthanum-Präzipitate in der ES Region nur apikal der TJs beobachtet werden. Die interzellularen Regionen des ES Epithels sowie das subepitheliale ES Gewebe waren hingegen weitgehend frei von Schwermetallionen – eine Tatsache, die eine deutliche parazelluläre Barriere des ES Epithels vermuten lässt (23). Weiter haben Messungen der Ionenkonzentrationen der cochleären Endolymphe eine hohe K<sup>+</sup> und geringe Na<sup>+</sup> Ionen Konzentrationen aufgezeigt während für die endolymphatische Flüssigkeit des ES geringe K<sup>+</sup> und hohe Na<sup>+</sup> Konzentrationen beschrieben wurden (97-100). Diese Daten werden zwar kontrovers diskutiert, da eine Messung der Ionenkonzentrationen der Endolymphe des ES technisch sehr aufwändig und aufgrund der sehr kleinen Volumina fehleranfällig ist. Dennoch ist in Zusammenschau mit den gesamten anderen Daten eine Equilibrierung der Endolymphe vor allem in Bezug auf Ionen und kleine Moleküle bereits im ED vorstellbar, während dem ES möglicherweise andere Funktionen wie beispielsweise Phagozytose oder Sekretion von größeren Makromolekülen zugeschrieben werden könnten. In diesem Zusammenhang wurde die Expression von sekretierten Makromolekülen wie beispielsweise Mucinen durch ES Gewebe beschrieben (24). Zusammenfassend können die Unterschiede in der subzellulären Claudin 3 Lokalisation sowie der quantitativen Expression verschiedener Claudine gemeinsam mit den ultrastrukturellen Daten die Theorie eines auf dem parazellulären Weg durchlässigen ED-Epithels und eines dichten distalen ES weiter untermauern.



## 4.2 Stimulierbarkeit von Claudinen in endolymphatischen Epithelien

Überraschend bei der Analyse der subzellulären Lokalisation war allerdings die Tatsache, dass einige der identifizierten Claudine wie Claudin 4, 6 und 16 weniger in den TJ und membranären Domänen lokalisiert waren sondern vielmehr im zytoplasmatischen Kompartiment detektiert wurden. Die Translokation von Claudinen aus dem Zytoplasma in die membranären Domänen bzw. TJ und *vice versa* aufgrund von posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung wurde bereits als Mechanismus in der Regulation der parazellulären Barriere- und Permeabilitätseigenschaften beschrieben (101-104). Daher drängte sich an dieser Stelle die Frage auf, ob diese zytoplasmatischen Claudine eventuell durch Hormone oder bestimmte Pharmaka in den untersuchten endolymphatischen Epithelien regulierbar seien. Zur Beantwortung dieser Frage wurde das Hormon ADH herangezogen, dessen Blutspiegel in einigen Studien mit dem Auftreten des MM korrelierte und das deshalb mit einer Dysregulation der endolymphatischen Ionen und Flüssigkeitshomeostase in Verbindung gebracht wurde (26, 27, 42). Tatsächlich wurde in einigen Tierstudien auch gezeigt, dass die chronische Verabreichung von ADH einen endolymphatischen Hydrops sowie die klinische Symptomatik des MM induzieren kann (4, 29, 46). Mechanistisch führt ADH in den Sammelrohren (SR) der Niere über den V2R und den cAMP/ PKA Pathway zu einer Translokation von AQP2 in die luminalen Membranen der SR Zellen. Dadurch kann Wasser entlang des osmotischen Gradienten über das Epithel gleichsam entlang einer transzellulären Route zurück in das Niereninterstitium gezogen und somit resorbiert werden (44). Da im ES Epithel die Expression von V2R und AQP2 beschrieben wurde (11, 45), wird der Mechanismus einer ADH regulierten endolymphatischen Ionen- und Flüssigkeitshomeostase in Analogie zur renalen Physiologie diskutiert (44). In der vorliegenden Studie konnten jedoch bei dDAVP simulierten ES mit der Translokation von Claudin 4 aus dem Zytoplasma in die basolateralen Membranen bzw. in die TJ Hinweise dafür gewonnen werden, dass in der endolymphatischen Ionen und Flüssigkeitshomeostase neben den transzellulären Mechanismen auch parazelluläre Prozesse von Bedeutung sind. Claudin 4 ist in vielen verschiedenen epithelialen Geweben wie den Sammelrohren der Niere, der Lunge, dem GI Trakt oder vielen Drüsen exprimiert (105-109). Bislang haben eine Reihe von Studien die Rolle von Claudin 4 beim Aufbau von parazellulären Barrieren beleuchtet: So wurde bei Überexpressionen von Claudin 4 mit nachfolgenden elektronenmikroskopischen Analysen von Gefrierbrüchen eine deutliche Zunahme der TJ Stränge sowie deren Komplexität beschrieben (105). Untersuchungen zu den parazellulären Barriere- und Permeabilitätseigenschaften von Claudin 4 lieferten je nach Studie aber zum Teil

abweichende Ergebnisse: So zeigen Daten, dass eine Überexpression von Claudin 4 mit einer Zunahme des transepithelialen Widerstandes ohne einer Veränderung der Permeabilität gegenüber verschiedenen Ionen verbunden ist (105, 110). Neuere Daten deuten hingegen darauf hin, dass Claudin 4 unter bestimmten Umständen als Pore fungieren kann: So führt die Interaktion von Claudin 4 mit Claudin 8 beispielsweise zur Translokation von Claudin 4 in die TJ und damit zur Ausbildung einer Chlorid spezifischen Anionenpore. Wird diese Interaktion zum Beispiel durch Depletion von Claudin 8 in SR Zellen der Niere aufgehoben, so resultiert daraus eine zytoplasmatische Verteilung von Claudin 4 und dementsprechend eine Abnahme der transepithelialen Chloridpermeabilität (20). Weiteres wurde in einer Keratinozytenzelllinie gezeigt, dass durch posttranslationale Modifizierung von Claudin 4 dessen subzelluläre Lokalisation reguliert werden kann. So konnte durch Phosphorylierung von Claudin 4 mittels einer PKC eine Translokation in die TJ induziert werden (111). Eine Rolle von ADH wurde aber im Zusammenhang mit der Regulierbarkeit von Claudin 4 oder anderen Claudinen aber nicht beschrieben. Zusammenfassend kann Claudin 4 als starkes barrierebildendes Claudin betrachtet werden, das unter bestimmten Bedingungen und moduliert durch zahlreiche Signalwege für bestimmte Ionen eine porenbildende Struktur einnehmen kann (20, 110). Spekulativ kann daher die Möglichkeit erwogen werden, dass ADH über Regulation von Claudin 4 und potentiell andere Claudine die parazellulären Barriereeigenschaften erhöht oder derart verändert, dass es zu Entgleisungen der endolymphatischen Ionen- und Flüssigkeitshomöostase bis hin zum endolymphatischen Hydrops und MM kommen kann. Mechanistisch bindet dDAVP als ADH Analogon spezifisch an den V2R und induziert dabei die Produktion von cAMP mit darauffolgender Aktivierung der PKA (44). Claudin 16, das über den selben PKA Pathway reguliert wird (104), zeigte jedoch keine Translokation nach dDAVP Stimulation (Daten nicht gezeigt). Daher ist es durchaus möglich, dass dDAVP Claudin 4 über einen anderen Pathway reguliert. Eine kürzlich erschienene Studie demonstrierte tatsächlich, dass ADH eine Reihe von Transportern wie den NKCC2 über den V2R/ WNK4/ SPAK Pathway im distalen Nephron reguliert (112). Auch wurde kürzlich gezeigt, dass die Aktivierung von WNK4 zur Phosphorylierung von Claudin 1, 3, 4 und 7 führen kann und dabei die parazellulären Permeabilitätseigenschaften moduliert (102, 103). Daher besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass dDAVP vielmehr über den V2R/ WNK4 Pathway und nicht über den cAMP/ PKA Pathway die Translokation von Claudin 4 in endolymphatischen Epithelien induziert. Entgültig ließe sich dies jedoch nur über weitere Experimente mit spezifischen Inhibitoren oder Knock-Out Tieren klären.

### 5.3 Vergleich der gewonnenen Expressionsdaten mit adulten Geweben

Um Hinweise dafür zu gewinnen, dass die aus den postnatalen ED und ES Proben (P04) gewonnenen Daten auch eine Relevanz für adulte Gewebe haben, wurden darüber hinaus die mRNA Expressionsdaten sowie die Immunfluoreszenz Analysen mit Daten von adulten Proben verglichen (Fig. 3 & 9). Hier konnte in adulten ES Epithelien die Expression von allen ausgewählten Claudine mit entsprechender subzellulärer Lokalisation bestätigt werden. Daher kann aufgrund der beobachteten Ähnlichkeiten davon ausgegangen werden, dass die Daten des postnatalen Gewebes inklusive der gewonnenen Stimulationsdaten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf den adulten Organismus übertragen werden können. Klärend sollte hier angeführt werden, dass adulte Gewebe aufgrund der sehr schwierigen präparatorischen Zugänglichkeit des EDs bzw. aufgrund der dichten Verwachsung mit dem umgebenden meningealen Gewebe nicht für die ED vs. ES Vergleiche bzw. Stimulationsexperimente eingesetzt wurden.

## 5 Zusammenfassung

Der endolymphatische Sack (ES) formt eine Erweiterung des membranösen Labyrinths und ist im Felsenbein bzw. mit seinen distalen Ausläufern in einer Duraduplikatur lokalisiert. Der ES steht dabei mit den anderen Anteilen des Innenohres wie der Kochlea und dem Vestibularorgan über den endolymphatischen Dukt (ED) in Verbindung (2). Es wird angenommen, dass ED und ES eine Rolle in der endolymphatischen Flüssigkeits- und Ionenregulation einnehmen, allerdings sind die exakten Mechanismen in den unterschiedlichen Anteilen des ED und ES bei diesem Prozess noch nicht hinreichend verstanden (3, 5, 6). Es ist allgemein bekannt, dass die Flüssigkeits- und Ionenhomöostase sowohl über trans- als auch parazelluläre Mechanismen des involvierten Epithels gesteuert wird (7, 8). Bislang wurde bereits eine breite Palette an Kanälen und Transportern im ES Epithel identifiziert, die möglicherweise die transzelluläre Komponente der Flüssigkeits- und Ionenhomöostase vermitteln (5, 10-13). Im Gegensatz dazu ist nur sehr wenig über die Mechanismen bekannt, die dem parazellulär vermittelten Anteil der Flüssigkeits- und Ionenhomöostase des ED und ES zugrunde liegen. Pionierarbeiten aus den 1980er Jahren wie beispielsweise elektronenmikroskopische Analysen von Gefrierbrüchen oder Lanthanum Injektionsexperimenten konnten bereits zeigen, dass der ED sowie die proximalen ES Anteile (PSP) deutlich weniger TJ Versiegelungsstränge und eine höhere Permeabilität für bestimmte Ionen im Vergleich zu den distalen ES Abschnitten (DSP) aufweisen (22, 23). Das erste Ziel im Rahmen dieser Studie bestand somit darin, die Daten zum ultrastrukturellen Erscheinungsbild von TJs im ED und ES mittels transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Studien zu reproduzieren und im Rahmen einer feinen Differenzierung zwischen unterschiedlichen ES Abschnitten noch weiter auszubauen. Tatsächlich konnten in der DSP TJ mit komplexerem Erscheinungsbild und einer größeren Anzahl von membranären „Kissing Points“ identifiziert werden, während im ED häufig seichte TJ mit zum Teil gar fehlenden membranären Berührungspunkten detektierbar waren. Abgesehen von einigen kleineren Studien, die die mRNA Expression von einigen Claudin Familienmitglieder im ES charakterisiert haben (24, 25), gibt es bisher kaum Daten, die die Unterschiede im ultrastrukturellen Erscheinungsbild der TJ oder die Rolle von parazellulären Mechanismen bei der endolymphatischen Flüssigkeits- und Ionenhomöostase näher beleuchten. Da die Claudine mit ihren knapp 30 Familienmitgliedern als entscheidende Komponenten des molekularen Aufbaus von TJ sowie des parazellulären Flüssigkeits- und Ionentransports beschrieben wurden (14, 66, 80), wurde im folgenden Schritt ein Hochdurchsatz qPCR- Screen zur Identifizierung der

im Epithel des ED und ES exprimierten Claudine angesetzt. Dabei konnten Claudin 3, 4, 6, 8, 10 und 16 sowohl im ED als auch ES auf mRNA Ebene detektiert werden. Aus zahlreichen Studien ist es jedoch auch hinreichend bekannt, dass die mRNA Expression häufig nicht mit der tatsächlichen Proteinexpression korreliert (87, 88). Im nächsten Schritt konnten daher mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nicht nur die qPCR Daten bestätigt und eine spezifische Proteinexpression der Zielmoleküle in den endolymphatischen Epithelien nachgewiesen werden, sondern auch mögliches molekulares Korrelat für die Unterschiede im ultrastrukturellen Erscheinungsbild der TJ im ED und ES identifiziert werden: Claudin 3, ein starkes barrierebildendes Claudin, dessen Überexpression auch mit einer deutlichen Zunahme der TJ Komplexität einhergeht (17, 93, 94), konnte in den Schnittpräparaten im ES vor allem in den TJ lokalisiert werden, während im ED eine basolaterale Lokalisation unabhängig von TJ vorherrschend war. Dies könnte somit die zahlreichen membranären Berührungspunkte und das komplexere Erscheinungsbild der TJ des ES erklären und eine Begründung für die seichten TJ im ED Bereich liefern.

Interessanterweise konnte in den Schnittpräparaten für einige Claudine wie Claudin 4, 6 oder 16 auch eine primär zytoplasmatische Lokalisation detektiert werden. Eine Translokation von Claudinen aus dem Zytoplasma in die TJ und Vice Versa aufgrund von posttranslationalen Modifikationen wurde bereits in zahlreichen Veröffentlichungen als Mechanismus zur Regulation der parazellulären Barriereigenschaften beschrieben (101-104). Daher wurde im letzten Teil der vorliegenden Arbeit die Frage beleuchtet, ob in endolymphatischen Epithelien die parazellulären Barrieremoleküle auch über ähnliche Mechanismen regulierbar sind. Tatsächlich konnte in ES Präparaten, die mit dem ADH Analogon dDAVP stimuliert wurden, eine Translokation von Claudin 4 aus dem Zytoplasma in die membranären Kompartimente sowie die TJ beobachtet werden. ADH ist ein Hormon, das in einigen Studien mit einer Dysregulation der endolymphatischen Flüssigkeits- und Ionenhomöostase und der Entwicklung des Morbus Meniere assoziiert ist (29, 30, 43, 46). Aufgrund der Tatsache, dass in ES Epithelien bereits die Expression von V2R und AQP2 gezeigt wurde (11, 45), wurden primär transzelluläre Mechanismen bei der Entwicklung des MM in Analogie zur renalen Physiologie postuliert. Die Tatsache allerdings, dass in der vorliegenden Studie dDAVP die Translokation von Claudin 4 in die TJ induzieren konnte, legt den Schluß nahe, dass bei der endolymphatischen Flüssigkeits und Ionenhomöostase auch parazelluläre Mechanismen beteiligt sein könnten.

## 6 Hinweise zur Veröffentlichung:

Zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Dissertationsschrift war diese noch in Vorbereitung bzw. in Arbeit

## 7 Literaturangaben

1. Michael Schünke, E. S., Udo Schumacher. (2009) Prometheus, Atlas der Anatomie. *Georg Thieme Verlag* **2. Auflage**, 132-140
2. Merchant SN., N. J. (2010) Schuknecht's Pathology of the Inner Ear. *People 's Medical Publishing House* **Third Edition**
3. Salt, A. N. (2001) Regulation of endolymphatic fluid volume. *Annals of the New York Academy of Sciences* **942**, 306-312
4. Salt, A. N., and Plontke, S. K. Endolymphatic hydrops: pathophysiology and experimental models. *Otolaryngol Clin North Am* **43**, 971-983
5. Kim, H. M., and Wangemann, P. (2010) Failure of fluid absorption in the endolymphatic sac initiates cochlear enlargement that leads to deafness in mice lacking pendrin expression. *PLoS One* **5**, e14041
6. Kimura, R. S. (1967) Experimental blockage of the endolymphatic duct and sac and its effect on the inner ear of the guinea pig. A study on endolymphatic hydrops. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **76**, 664-687
7. Zeuthen, T. (2002) General models for water transport across leaky epithelia. *Int Rev Cytol* **215**, 285-317
8. Fischbarg, J. (2010) Fluid transport across leaky epithelia: central role of the tight junction and supporting role of aquaporins. *Physiological reviews* **90**, 1271-1290
9. Matsubara, A., Miyashita, T., Inamoto, R., Hoshikawa, H., and Mori, N. (2014) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the endolymphatic sac of the rat. *Auris, nasus, larynx* **41**, 409-412
10. Kim, S. H., Park, H. Y., Choi, H. S., Chung, H. P., and Choi, J. Y. (2009) Functional and molecular expression of epithelial sodium channels in cultured human endolymphatic sac epithelial cells. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* **30**, 529-534
11. Maekawa, C., Kitahara, T., Kizawa, K., Okazaki, S., Kamakura, T., Horii, A., Imai, T., Doi, K., Inohara, H., and Kiyama, H. (2010) Expression and translocation of aquaporin-2 in the endolymphatic sac in patients with Meniere's disease. *Journal of neuroendocrinology* **22**, 1157-1164
12. Kakigi, A., Nishimura, M., Takeda, T., Taguchi, D., and Nishioka, R. (2009) Expression of aquaporin1, 3, and 4, NKCC1, and NKCC2 in the human endolymphatic sac. *Auris, nasus, larynx* **36**, 135-139
13. Nishimura, M., Kakigi, A., Takeda, T., Takeda, S., and Doi, K. (2009) Expression of aquaporins, vasopressin type 2 receptor, and Na<sup>+</sup>(-)/K<sup>+</sup>(-)/Cl<sup>-</sup> cotransporters in the rat endolymphatic sac. *Acta oto-laryngologica* **129**, 812-818
14. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539-1550
15. Tsukita, S., and Furuse, M. (1998) Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes Cells* **3**, 569-573
16. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126**, 741-754
17. Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Gunzel, D., Muller, D., Schulzke, J. D., Amasheh, S., and Fromm, M. (2010) Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochimica et biophysica acta* **1798**, 2048-2057

18. Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D., and Fromm, M. (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of cell science* **115**, 4969-4976
19. Gunzel, D., Amasheh, S., Pfaffenbach, S., Richter, J. F., Kausalya, P. J., Hunziker, W., and Fromm, M. (2009) Claudin-16 affects transcellular Cl<sup>-</sup> secretion in MDCK cells. *The Journal of physiology* **587**, 3777-3793
20. Hou, J., Renigunta, A., Yang, J., and Waldegger, S. (2010) Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 18010-18015
21. Tamura, A., and Tsukita, S. (2014) Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barrierology revealed in knockout mice. *Seminars in cell & developmental biology* **36**, 177-185
22. Lundquist, P.-G. (1981) Intercellular junctions in the epithelium of the endolymphatic sac: a freeze-fracture and TEM study on the guinea pig's labyrinth. *Menière's Disease. Georg Thieme, New York*, 127-140
23. Rask-Andersen, H., Bredberg, G., Lyttkens, L., and Loof, G. (1981) The function of the endolymphatic duct--an experimental study using ionic lanthanum as a tracer: a preliminary report. *Annals of the New York Academy of Sciences* **374**, 11-19
24. Friis, M., Martin-Bertelsen, T., Friis-Hansen, L., Winther, O., Henao, R., Sorensen, M. S., and Qvortrup, K. (2011) Gene expression of the endolymphatic sac. *Acta otolaryngologica* **131**, 1257-1263
25. Matsubara, A., Miyashita, T., Mori, T., Akiyama, K., Inamoto, R., and Mori, N. (2012) The mRNA of claudins is expressed in the endolymphatic sac epithelia. *Auris, nasus, larynx* **39**, 361-364
26. Aoki, M., Ando, K., Kuze, B., Mizuta, K., Hayashi, T., and Ito, Y. (2005) The association of antidiuretic hormone levels with an attack of Meniere's disease. *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* **30**, 521-525
27. Kakigi, A., and Takeda, T. (2009) Antidiuretic hormone and osmolality in patients with Meniere's disease. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* **71**, 11-13
28. Kumagami, H., Loewenheim, H., Beitz, E., Wild, K., Schwartz, H., Yamashita, K., Schultz, J., Paysan, J., Zenner, H. P., and Ruppertsberg, J. P. (1998) The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **436**, 970-975
29. Takeda, T., Takeda, S., Kitano, H., Okada, T., and Kakigi, A. (2000) Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hearing research* **140**, 1-6
30. Katagiri, Y., Takumida, M., Hirakawa, K., and Anniko, M. (2014) Long-term administration of vasopressin can cause Meniere's disease in mice. *Acta otolaryngologica* **134**, 990-1004
31. Guild, S. (1927) The circulation of the Endolymph. *Am J Anat* **39**, 57 - 81
32. Lo, W. W., Daniels, D. L., Chakeres, D. W., Linthicum, F. H., Jr., Ulmer, J. L., Mark, L. P., and Swartz, J. D. (1997) The endolymphatic duct and sac. *AJNR. American journal of neuroradiology* **18**, 881-887
33. Dahlmann, A., and von Düring, M. (1995) The endolymphatic duct and sac of the rat: a histological, ultrastructural, and immunocytochemical investigation. *Cell and tissue research* **282**, 277-289
34. Schindler, R. A. (1980) The ultrastructure of the endolymphatic sac in man. *Laryngoscope* **90**, 1-39



35. Bagger-Sjoberg, D., Friberg, U., and Rask-Anderson, H. (1986) The human endolymphatic sac. An ultrastructural study. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **112**, 398-409
36. Moller, M. N., Caye-Thomasen, P., and Qvortrup, K. (2013) Oxygenated fixation demonstrates novel and improved ultrastructural features of the human endolymphatic sac. *Laryngoscope* **123**, 1967-1975
37. Qvortrup, K., and Rostgaard, J. (1994) Ultrastructure of the epithelial cells of the endolymphatic duct in the rat. *Acta oto-laryngologica* **114**, 30-39
38. Qvortrup, K., Rostgaard, J., Holstein-Rathlou, N. H., and Bretlau, P. (1999) The endolymphatic sac, a potential endocrine gland? *Acta oto-laryngologica* **119**, 194-199
39. Tomiyama, S., and Harris, J. P. (1986) The endolymphatic sac: its importance in inner ear immune responses. *Laryngoscope* **96**, 685-691
40. Kimura, S. (1965) Membranous Hydrops in the Inner Ear of the Guinea Pig after Obliteration of the Endolymphatic Sac. *Practica Oto\_Rhino\_Laryngologica* **27**, 342
41. Hallpike, C. (1938) Observations on the Pathology of Ménière's Syndrome. *Proc R Soc Med* **31**, 1317
42. Takeda, T., Kakigi, A., and Saito, H. (1995) Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta oto-laryngologica. Supplementum* **519**, 219-222
43. Takeda, T., Takeda, S., Kakigi, A., Okada, T., Nishioka, R., Taguchi, D., Nishimura, M., and Nakatani, H. (2010) Hormonal aspects of Meniere's disease on the basis of clinical and experimental studies. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* **71 Suppl 1**, 1-9
44. Nielsen, S., Frokiaer, J., Marples, D., Kwon, T. H., Agre, P., and Knepper, M. A. (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiological reviews* **82**, 205-244
45. Taguchi, D., Takeda, T., Kakigi, A., Takumida, M., Nishioka, R., and Kitano, H. (2007) Expressions of aquaporin-2, vasopressin type 2 receptor, transient receptor potential channel vanilloid (TRPV)1, and TRPV4 in the human endolymphatic sac. *Laryngoscope* **117**, 695-698
46. Degerman, E., In 't Zandt, R., Palbrink, A., and Magnusson, M. (2015) Vasopressin induces endolymphatic hydrops in mouse inner ear, as evaluated with repeated 9.4 T MRI. *Hearing research*
47. Ikari, A., Ito, M., Okude, C., Sawada, H., Harada, H., Degawa, M., Sakai, H., Takahashi, T., Sugatani, J., and Miwa, M. (2008) Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase A independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway. *Journal of cellular physiology* **214**, 221-229
48. D'Souza, T., Agarwal, R., and Morin, P. J. (2005) Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **280**, 26233-26240
49. Fromter, E., and Diamond, J. (1972) Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature: New biology* **235**, 9-13
50. Markadieu, N., and Delpire, E. (2014) Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **466**, 91-105
51. Knepper, M. A., Kwon, T. H., and Nielsen, S. (2015) Molecular Physiology of Water Balance. *The New England journal of medicine* **373**, 196
52. Eladari, D., Chambrey, R., Picard, N., and Hadchouel, J. (2014) Electroneutral absorption of NaCl by the aldosterone-sensitive distal nephron: implication for normal electrolytes homeostasis and blood pressure regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **71**, 2879-2895

53. Farquhar, M. G., and Palade, G. E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* **17**, 375-412
54. Van Itallie, C. M., and Anderson, J. M. (2014) Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in cell & developmental biology* **36**, 157-165
55. Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., and Anderson, J. M. (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* **273**, 29745-29753
56. Capaldo, C. T., Koch, S., Kwon, M., Laur, O., Parkos, C. A., and Nusrat, A. (2011) Tight junction zonula occludens-3 regulates cyclin D1-dependent cell proliferation. *Molecular biology of the cell* **22**, 1677-1685
57. Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R., Huerta, M., and Lopez-Bayghen, E. (2009) The tight junction protein ZO-2 blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1165**, 121-125
58. Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., and Goodenough, D. A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* **103**, 755-766
59. Jesaitis, L. A., and Goodenough, D. A. (1994) Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* **124**, 949-961
60. Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J., and Stevenson, B. R. (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* **141**, 199-208
61. Fanning, A. S., and Anderson, J. M. (2009) Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1165**, 113-120
62. Xu, J., Kausalya, P. J., Phua, D. C., Ali, S. M., Hossain, Z., and Hunziker, W. (2008) Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Molecular and cellular biology* **28**, 1669-1678
63. Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2008) Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular biology of the cell* **19**, 2465-2475
64. Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* **143**, 391-401
65. Maher, G. J., Hilton, E. N., Urquhart, J. E., Davidson, A. E., Spencer, H. L., Black, G. C., and Manson, F. D. (2011) The cataract-associated protein TMEM114, and TMEM235, are glycosylated transmembrane proteins that are distinct from claudin family members. *FEBS letters* **585**, 2187-2192
66. Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., and Tsukita, S. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS letters* **585**, 606-612
67. Vipperla, B., Dass, J. F., and Jayanthi, S. (2014) Insilico modeling and molecular dynamic simulation of claudin-1 point mutations in HCV infection. *Journal of biomolecular structure & dynamics* **32**, 1443-1455
68. Marks, D. S., Colwell, L. J., Sheridan, R., Hopf, T. A., Pagnani, A., Zecchina, R., and Sander, C. (2011) Protein 3D structure computed from evolutionary sequence variation. *PLoS One* **6**, e28766

69. Rossa, J., Protze, J., Kern, C., Piontek, A., Gunzel, D., Krause, G., and Piontek, J. (2014) Molecular and structural transmembrane determinants critical for embedding claudin-5 into tight junctions reveal a distinct four-helix bundle arrangement. *The Biochemical journal* **464**, 49-60
70. Rossa, J., Ploeger, C., Vorreiter, F., Saleh, T., Protze, J., Gunzel, D., Wolburg, H., Krause, G., and Piontek, J. (2014) Claudin-3 and claudin-5 protein folding and assembly into the tight junction are controlled by non-conserved residues in the transmembrane 3 (TM3) and extracellular loop 2 (ECL2) segments. *The Journal of biological chemistry* **289**, 7641-7653
71. Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., Tsukita, S., Nureki, O., and Fujiyoshi, Y. (2014) Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* **344**, 304-307
72. Saitoh, Y., Suzuki, H., Tani, K., Nishikawa, K., Irie, K., Ogura, Y., Tamura, A., Tsukita, S., and Fujiyoshi, Y. (2015) Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Science* **347**, 775-778
73. Krause, G., Protze, J., and Piontek, J. (2015) Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Seminars in cell & developmental biology*
74. Stiffler, M. A., Chen, J. R., Grantcharova, V. P., Lei, Y., Fuchs, D., Allen, J. E., Zaslavskaja, L. A., and MacBeath, G. (2007) PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science* **317**, 364-369
75. Claude, P. (1978) Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *The Journal of membrane biology* **39**, 219-232
76. Gonzalez-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., Lazaro, A., and Cereijido, M. (1989) Establishment of tight junctions between cells from different animal species and different sealing capacities. *The Journal of membrane biology* **107**, 43-56
77. Stevenson, B. R., Anderson, J. M., Goodenough, D. A., and Mooseker, M. S. (1988) Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J Cell Biol* **107**, 2401-2408
78. Furuse, M., Sasaki, H., and Tsukita, S. (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* **147**, 891-903
79. Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S. (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* **153**, 263-272
80. Gunzel, D., and Yu, A. S. (2013) Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews* **93**, 525-569
81. Van Itallie, C. M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L. S., Holmes, J., and Anderson, J. M. (2006) Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F1288-1299
82. Hanssen, O., Castermans, E., Bovy, C., Weekers, L., Epicum, P., Dubois, B., Bours, V., Krzesinski, J. M., and Jouret, F. (2014) Two novel mutations of the CLDN16 gene cause familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Clin Kidney J* **7**, 282-285
83. Hou, J., Renigunta, A., Gomes, A. S., Hou, M., Paul, D. L., Waldegger, S., and Goodenough, D. A. (2009) Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 15350-15355

84. Hou, J., and Goodenough, D. A. (2010) Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **19**, 483-488
85. Hou, J., Rajagopal, M., and Yu, A. S. (2013) Claudins and the kidney. *Annu Rev Physiol* **75**, 479-501
86. Rask-Andersen, H., Bredberg, G, Stahle, J. (1981) Structure and function of the endolymphatic duct. *Ménière's Disease: : Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. International Symposium, Dusseldorf, New York, Georg Thieme, New York*, 99 - 109
87. Maier, T., Guell, M., and Serrano, L. (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters* **583**, 3966-3973
88. de Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M., and Vogel, C. (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* **5**, 1512-1526
89. Taguchi, D., Kakigi, A., Takeda, T., Sawada, S., and Nakatani, H. (2010) Diagnostic value of plasma antidiuretic hormone, electrocochleography, and glycerol test in patients with endolymphatic hydrops. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* **71 Suppl 1**, 26-29
90. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology* **8**, R19
91. Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* **147**, 185-194
92. Eckhard, A., Gleiser, C., Arnold, H., Rask-Andersen, H., Kumagami, H., Muller, M., Hirt, B., and Lowenheim, H. (2012) Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. *Molecular aspects of medicine* **33**, 612-637
93. Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E. H., Risau, W., and Engelhardt, B. (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* **105**, 586-592
94. Ilani, N., Armanious, N., Lue, Y. H., Swerdloff, R. S., Baravarian, S., Adler, A., Tsang, C., Jia, Y., Cui, Y. G., Wang, X. H., Zhou, Z. M., Sha, J. H., and Wang, C. (2012) Integrity of the blood-testis barrier in healthy men after suppression of spermatogenesis with testosterone and levonorgestrel. *Hum Reprod* **27**, 3403-3411
95. Hashimoto, K., Oshima, T., Tomita, T., Kim, Y., Matsumoto, T., Joh, T., and Miwa, H. (2008) Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochemical and biophysical research communications* **376**, 154-157
96. Hou, J., Gomes, A. S., Paul, D. L., and Goodenough, D. A. (2006) Study of claudin function by RNA interference. *The Journal of biological chemistry* **281**, 36117-36123
97. Couloigner, V., Teixeira, M., Sterkers, O., and Ferrary, E. (1999) In vivo study of the electrochemical composition of luminal fluid in the guinea pig endolymphatic sac. *Acta oto-laryngologica* **119**, 200-202
98. Mori, N., Uozumi, N., Furuta, H., and Hoshikawa, H. (1998) Effect of acetazolamide on cation concentration in the endolymph of the endolymphatic sac. *Acta oto-laryngologica. Supplementum* **533**, 12-15
99. Ikeda, K., and Morizono, T. (1991) The ionic and electric environment in the endolymphatic sac of the chinchilla: relevance to the longitudinal flow. *Hearing research* **54**, 118-122
100. Mori, N., Ninoyu, O., and Morgenstern, C. (1987) Cation transport in the ampulla of the semicircular canal and in the endolymphatic sac. *Arch Otorhinolaryngol* **244**, 61-65

101. French, A. D., Fiori, J. L., Camilli, T. C., Leotlela, P. D., O'Connell, M. P., Frank, B. P., Subaran, S., Indig, F. E., Taub, D. D., and Weeraratna, A. T. (2009) PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* **6**, 93-101
102. Yamauchi, K., Rai, T., Kobayashi, K., Sohara, E., Suzuki, T., Itoh, T., Suda, S., Hayama, A., Sasaki, S., and Uchida, S. (2004) Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4690-4694
103. Tatum, R., Zhang, Y., Lu, Q., Kim, K., Jeansonne, B. G., and Chen, Y. H. (2007) WNK4 phosphorylates ser(206) of claudin-7 and promotes paracellular Cl(-) permeability. *FEBS letters* **581**, 3887-3891
104. Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., and Miwa, M. (2006) Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *Journal of cell science* **119**, 1781-1789
105. Van Itallie, C., Rahner, C., and Anderson, J. M. (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* **107**, 1319-1327
106. Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., and Tsukita, S. (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* **13**, 875-886
107. Schlingmann, B., Molina, S. A., and Koval, M. (2015) Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function. *Seminars in cell & developmental biology*
108. Rahner, C., Mitic, L. L., and Anderson, J. M. (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* **120**, 411-422
109. Xiang, R. L., Mei, M., Cong, X., Li, J., Zhang, Y., Ding, C., Wu, L. L., and Yu, G. Y. (2014) Claudin-4 is required for AMPK-modulated paracellular permeability in submandibular gland cells. *J Mol Cell Biol* **6**, 486-497
110. Michikawa, H., Fujita-Yoshigaki, J., and Sugiya, H. (2008) Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell and tissue research* **334**, 255-264
111. Aono, S., and Hirai, Y. (2008) Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Experimental cell research* **314**, 3326-3339
112. Saritas, T., Borschewski, A., McCormick, J. A., Paliege, A., Dathe, C., Uchida, S., Terker, A., Himmerkus, N., Bleich, M., Demaretz, S., Laghmani, K., Delpire, E., Ellison, D. H., Bachmann, S., and Mutig, K. (2013) SPAK differentially mediates vasopressin effects on sodium cotransporters. *J Am Soc Nephrol* **24**, 407-418

## 8 Erklärung Eigenanteil

- a. Konzipierung der Claudin Studie: **Dr. Gleiser und Daniel Runggaldier**
- b. Durchführung der Versuche und der Auswertung:
  - i. TEM: Durchführung der ES Präparation: Prof. Hirt; Anfertigung der TEM Aufnahmen: Ulrich Mattheus; **Auswertung der gesamten TEM Aufnahmen: Daniel Runggaldier**
  - ii. „Fluidigm“ qPCR Analyse: Durchführung des ES Präparation: Prof. Hirt; **Etablierung und Durchführung der RNA Isolierung: Daniel Runggaldier; Planung der Fluidigm Experimente: Daniel Runggaldier;** Durchführung der Fluidigm qPCR Reaktion: Sabine Conrad; **Auswertung der Fluidigm qPCR Ergebnisse: Daniel Runggaldier; Selektierung der Claudin Targets für weitere Analyse: Daniel Runggaldier**
  - iii. Identifizierung von Claudin 10 Isoformen im ED und ES mittels RT-PCR: **Primer Design und Planung des Experiments: Daniel Runggaldier; RNA Isolierung: Daniel Runggaldier;** PCR und Gelelektrophorese: Lidia Garcias; **Auswertung: Daniel Runggaldier**
  - iv. Whole Mount Färbungen: Durchführung des ES Präparation: Prof. Hirt; **Färbung der Whole Mount Säcke: Daniel Runggaldier u. Dr. Gleiser;** Anfertigung der Apotom Aufnahmen: Peter Neckel; **Anfertigung der LSM Aufnahmen: Daniel Runggaldier; Auswertung der Ergebnisse: Daniel Runggaldier**
  - v. Schnittpräparate des ED und ES: Durchführung des ES Präparation: Prof. Hirt; Anfertigung der Kryoschnitte: Dr. Gleiser; Färben: Lidia Garcias; **Anfertigung der LSM Aufnahmen: Daniel Runggaldier u. Dr. Gleiser; Auswertung der Ergebnisse: Daniel Runggaldier**
  - vi. dDAVP Stimulationsexperimente: Durchführung des ES Präparation: Prof. Hirt; **3h Stimulierung der ES in DMEM Medium: Daniel Runggaldier u. Dr. Gleiser;** Anfertigung der Kryoschnitte: Dr. Gleiser; **Anfertigung der LSM Aufnahmen: Daniel Runggaldier u. Dr. Gleiser**
  - vii. Färbungen von adulten Schnittpräparaten: Durchführung des ES Präparation: Prof. Hirt; Anfertigung der Kryoschnitte: Dr. Gleiser; Färben: Lidia Garcias; **Anfertigung der LSM Aufnahmen: Daniel Runggaldier u. Dr. Gleiser; Auswertung der Ergebnisse: Daniel Runggaldier**
- c. Durchführung von Daten Recherchen: **Daniel Runggaldier u. Dr. Gleiser**
- d. Betreuung der Arbeit: Prof. Hirt und Dr. Gleiser
- e. Verfassen der Veröffentlichung: **Daniel Runggaldier u. Dr. Gleiser**